

Projekt HYALURONAN-Polymer
Entwicklung eines nachhaltigen biotechnologischen Verfahrens zur Herstellung
definierter Hyaluronsäure-Polymere für die Biomedizin

AZ 30812

Abschlussbericht (01.06.2013 – 31.08.2016)

Verfasser:

RWTH Aachen University:

Prof. Dr. rer. nat. Lothar Elling (Koordination)

Lehr- und Forschungsgebiet Biomaterialien

Institut für Biotechnologie und Institut für Biomedizinische Technik (Biomat)

Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Schwaneberg

Lehrstuhl für Biotechnologie (Biotec)

Prof. Dr.-Ing. Lars M. Blank

Lehrstuhl für Angewandte Mikrobiologie

Institut für Angewandte Mikrobiologie (iAMB)

GALAB Laboratories GmbH (GALAB)

Dr. rer. nat. Jürgen Kuballa

GALAB Laboratories GmbH

Neue Adresse:

Am Schleusengraben 7

D-21029 Hamburg

ifu Hamburg GmbH

Mieke Klein

Max-Brauer-Allee 50

22765 Hamburg

Projektbeginn: 01.06.2013

Laufzeit: 38 Monate

Aachen, 30.11.2016

Inhaltsverzeichnis

Projektkennblatt	9
1. Zusammenfassung (Kurzfassung des Berichts)	10
2. Bericht	11
2.1 Zielsetzung und Anlass des Vorhabens	11
2.2 Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden	11
3. Ergebnisse, Diskussion und Fazit	13
3.1. Arbeitsprogramm 5.1 (AG Elling): Enzymmodule für die Synthese von UDP-GlcA und UDP-GlcNAc zur Synthese von HA Polymeren	13
3.1.1 Arbeitspaket 1 (AP1)	14
3.1.2 Arbeitspaket 2 (AP2)	15
3.1.3 Arbeitspaket 3 (AP3)	15
3.1.4 Arbeitspaket 4 (AP4)	18
3.1.5 Arbeitspaket 5 (AP5)	20
3.2 Arbeitsprogramm 5.2 (AG Schwaneberg): Protein Engineering einer ausgewählten HA-Synthase	25
3.2.1 Arbeitspaket 6 (AP6)	25
3.2.2 Arbeitspaket 7 (AP7)	26
3.2.3 Arbeitspaket 8 (AP8)	27
3.2.4 Arbeitspaket 9 (AP9)	28
3.2.5 Arbeitspaket 10 (AP10)	29
3.2.6 Arbeitspaket 11 (AP11)	30
3.2.7 Arbeitspaket 12 (AP12)	31
3.2.8 Arbeitspaket 13 (AP13)	32
3.2.9 Arbeitspaket 14 (AP14)	32
3.3 Arbeitsprogramm 5.3 (AG Blank): Metabolic Engineering einer Hyaluronsäure produzierenden Bäckerhefe	33
3.3.1 Arbeitspaket 15 (AP15)	33
3.3.2 Arbeitspaket 16 (AP16)	35
3.3.3 Arbeitspaket 17 (AP17)	37
3.3.4 Arbeitspaket 18 (AP18)	39
3.4 Arbeitsprogramm 5.4 (GALAB): Produktcharakterisierung, Produktaufarbeitung und Fermentation	41
3.4.1 Arbeitspaket 20 (AP20)	41
3.4.2 Arbeitspaket 21 (AP21)	46
3.4.3 Arbeitspaket 22 (AP22)	47
3.4.4 Arbeitspaket 23 (AP23)	48

3.5	Arbeitsprogramm 5.5 (IFU, Hamburg): Ökobilanzielle Bewertung des Vorhabens	49
3.5.1	Arbeitspaket 19 (AP19)	49
4.	Öffentlichkeitsarbeit.....	54
5.	Fazit	54
6.	Literaturangaben	54
7.	Anlagen/Anhang	56
Anlage 1	57
Anlage 2	59
Anlage 3	59

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 2.2.1:** Projektübersicht mit Kooperationspartnern. **8**
- Abbildung 3.1.1:** Enzymmodule für die HA Synthese: UDP-GlcA-Modul, UDP-GlcNAc-Modul und HAS-Modul mit integrierten Nukleotidzucker Regenerationssystemen. **9**
- Abbildung 3.1.2:** MP-CE Elektropherogramm einer kombinierten Synthese von UDP-GlcA und UDP-GlcNAc mit Trennung und Detektion aller Nukleotide und Nukleotidzucker. 1. NAD⁺, 2. NADH, 3. UDP-GlcNAc, 4. UDP-Glc, 5. PABA (interner Standard), 6. UMP, 7. ADP, 8. UDP-GlcA, 9. ATP, 10. UDP, 11. UTP. **10**
- Abbildung 3.1.3:** Einfluss der Substratkonzentration auf die pmHAS-Reaktion bei einem Verhältnis der beiden Nukleotidzucker von 1:1. **A:** Analyse der UDP-Bildung mittels MP-CE Analytik. **B:** Analyse der HA-Bildung auf Agarose-Gelen mit *stains-all* Färbung; dargestellt ist die HA-Polymer Bildung nach unterschiedlichen Reaktionszeiten. Kommerzielle HA Proben dienten als Standards (S): S1: Select-HA HiLadder™ (Hyalose LLC), Mw = 495, 572, 966, 1090, 1510 kDa (0,6 µg); S2: hochmolekulare HA (Contipro Biotech), Mw ≥ 2 MDa (4 µg). **12**
- Abbildung 3.1.4:** Einfluss unterschiedlicher Verhältnisse der Nukleotidzucker auf die pmHAS-Reaktion. **A:** Analyse der UDP-Bildung mittels MP-CE Analytik, Ausschnitt aus den ersten 4 h. **B:** Analyse der HA-Bildung auf Agarose-Gelen mit *stains-all* Färbung beispielhaft für ein UDP-GlcA/UDP-GlcNAc Verhältnis von 1:10 und 10:1. UDP-GlcA = UGA, UDP-GlcNAc = UGN. Standards: S2: hochmolekulare HA (Contipro Biotech), Mw ≥ 2 MDa (4 µg); S3: DNA 1 kb Leiter, Mw 0,25-10 kb. **13**
- Abbildung 3.1.5:** Kombination der Enzymmodule für UDP-GlcA (AP1) und UDP-GlcNAc (AP2) mit dem HAS-Modul (AP4). Die Reaktion wurde ausgehend von UDP-Glc und GlcNAc gestartet, der Reaktionsansatz beinhaltete dabei 10 mM UDP-Glc, 20 mM NAD⁺, 10 mM GlcNAc, 10 mM ATP und 10 mM UTP. **A:** Verlauf der Konzentration aller Nukleotid-Edukte/Produkte des Enzymmodulsystems mittels MP-CE-Analytik. **B:** zugehöriges Agarose-Gel mit *stains-all* Färbung. S1: Select-HA HiLadder™ (Hyalose LLC), Mw = 495, 572, 966, 1090, 1510 kDa (0,6 µg). **14**
- Abbildung 3.1.6:** Vergleich der Aufschluss- bzw. Permeabilisierungsmethoden für die HA Synthese mit *E. coli* Zell-Lysat bzw. permeabilisierten *E. coli* Zellen. Agarose-Gel mit *stains-all* Färbung. Der Reaktionsansatz startete mit 5 mM UDP-GlcA und 5 mM UDP-GlcNAc. PMB = Polymyxin B, US = Ultraschall. S1: Select-HA HiLadder™ (Hyalose LLC), Mw = 495, 572, 966, 1090, 1510 kDa (0,6 µg); S2: hochmolekulare HA (Contipro Biotech), Mw ≥ 2 MDa (10 µg). **15**
- Abbildung 3.1.7:** HA Synthese mit HAS-haltigem Zell-Lysat (Aufschluss mit Ultraschall), sowohl mit Nukleotidzuckern (NZ) als auch mit entsprechenden Enzymmodulen (EM) als Substrat. Der NZ-Reaktionsansatz startete mit 5 mM UDP-GlcA und 5 mM UDP-GlcNAc, der EM-Reaktionsansatz mit 200 mM Saccharose, 5 mM UDP, 10 mM NAD⁺, 5 mM GlcNAc, 5 mM ATP, 5 mM UTP. K (Kontrolle): das Zell-Lysat wurde nur mit Puffer inkubiert. Agarose-Gel mit *stains-all* Färbung. S1: Select-HA HiLadder™ (Hyalose LLC), Mw = 495, 572, 966, 1090, 1510 kDa (0,6 µg); S2: hochmolekulare HA (Contipro Biotech), Mw ≥ 2 MDa (2,5 µg). **15**
- Abbildung 3.1.8:** HA Synthese mit einer Suspension HAS-exprimierender *E. coli* Zellen. NZ: mit Nukleotidzuckern als Substrat (5 mM UDP-GlcA und 5 mM UDP-GlcNAc); EM: mit Enzymmodulen als Substrat (200 mM Saccharose, 5 mM UDP, 10 mM NAD⁺, 5 mM GlcNAc, 5 mM ATP und 5 mM UTP). Agarose-Gel mit *stains-all* Färbung. S1: Select-HA HiLadder™ (Hyalose LLC), Mw = 495, 572, 966, 1090, 1510 kDa (0,6 µg); S2: hochmolekulare HA (Contipro Biotech), Mw ≥ 2 MDa (10 µg). **16**
- Abbildung 3.1.9:** Eintopf-Synthese von HA durch Kombination aller Enzymmodule mit pmHAS ausgehend von Saccharose und GlcNAc mit integrierter UDP-GlcA Regeneration (Abb. 3.1.1). **A:** Start mit UDP-Glc ohne UDP Regeneration (ohne SuSy), Reaktionsansatz: 10 mM UDP-Glc, 20 mM NAD⁺, 10 mM GlcNAc, 10 mM ATP und 10 mM UTP. **B–E:** Start mit unterschiedlichen UDP-Konzentrationen und mit SuSy und Saccharose für die UDP-GlcA Regeneration, Reaktionsansatz: 200 mM Saccharose variierende UDP Konzentrationen, 20 mM NAD⁺, 10 mM GlcNAc, 10 mM ATP und 10 mM UTP. In allen Ansätzen wurde die UDP-GlcNAc Synthese ausgehend von 10 mM GlcNAc gestartet. **K:** pmHAS

Reaktion mit Nukleotidzuckern, Reaktionsansatz: 10 mM UDP-GlcA und 10 mM UDP-GlcNAc. Agarose-Gel mit *stains-all* Färbung. S1: Select-HA HiLadder™ (Hyalose LLC), Mw = 495, 572, 966, 1090, 1510 kDa (0,6 µg); S2: hochmolekulare HA (Contipro Biotech), Mw ≥ 2 MDa (2,5 µg). **17**

Abbildung 3.1.10: HA Produktbildung der Ansätze aus Abb. 3.1.9, gemessen mittels CTAB-Trübungsmethode. Bei einem vollständigen Umsatz wird eine HA Konzentration von 4 mg/mL im Syntheseansatz erwartet; für den Assay wurden die Proben 1:20 verdünnt, so dass 0,2 mg/mL auf der y-Achse dem möglichen Maximum entsprechen. **18**

Abbildung 3.1.11: Verläufe der Nukleotid- und Nukleotidzuckerkonzentrationen in den Syntheseansätzen B und E aus Abbildung 3.1.9, gemessen mit MP-CE. **Ansatz B (links):** mit UDP-Regeneration, 0,02 mM UDP. **Ansatz E (rechts):** mit UDP-Regeneration, 10 mM UDP. In beiden Regenerationsansätzen bleibt die Menge an UDP auf einem konstant niedrigen Niveau, während UDP-GlcA in dem Maße ansteigt, wie das im HAS-Modul freigesetzte UDP wieder für die Regeneration von UDP-GlcA genutzt wird. **18**

Abbildung 3.1.12: Eintopfsynthese von HA unter Kombination aller Enzymmodule mit permeabilisierten *E. coli* Zellen ausgehend von Saccharose und GlcNAc mit integrierter UDP-GlcA Regeneration. Die permeabilisierten Zellen wurden durch Behandlung mit Polymyxin B erzeugt. **A:** ausgehend von UDP-Glc, Reaktionsansatz: 5 mM UDP-Glc, 10 mM NAD⁺, 5 mM GlcNAc, 5 mM ATP und 5 mM UTP. **B:** mit UDP-GlcA Regeneration, 5 mM UDP; Reaktionsansatz: 200 mM Saccharose, 5 mM UDP, 10 mM NAD⁺, 5 mM GlcNAc, 5 mM ATP und 5 mM UTP. **C:** mit UDP-GlcA Regeneration, 0,02 mM UDP; Reaktionsansatz: 200 mM Saccharose, 0,02 mM UDP, 10 mM NAD⁺, 5 mM GlcNAc, 5 mM ATP und 5 mM UTP. Agarose-Gele mit *stains-all* Färbung. S1: Select-HA HiLadder™ (Hyalose LLC), Mw = 495, 572, 966, 1090, 1510 kDa (0,6 µg); S2: hochmolekulare HA (Contipro Biotech), Mw ≥ 2 MDa (10 µg). **19**

Abbildung 3.2.1: Übersicht der Arbeitspakete (AP) zum **Arbeitsprogramm 5.2.** **21**

Abbildung 3.2.2: Hyaluronsäure-Synthese (blaue Banden) mittels in *E. coli* produzierter Hyaluronsäure-Synthase (szHAS) zu verschiedenen Synthesezeitpunkten (in Minuten). **M:** HA Standard. **22**

Abbildung 3.2.3: Nachweis der Hyaluronsäure-Synthese im 96er Mikrotiterplattenformat. **22**

Abbildung 3.2.4: Homologiemodell der szHAS und der identifizierte „Cysteincluster“ (roter Kasten). **24**

Abbildung 3.2.5: In den Sättigungsmutagenese-Bibliotheken des „Cysteinclusters“ wurden keine Varianten identifiziert, die längere HA-Ketten im Vergleich zum Wildtyp produzieren **25**

Abbildung 3.2.6: Einstellen der fehlerhaften PCR (epPCR) Bedingungen. Die Erhöhung der MnCl₂ Konzentration in der fehlerhaften PCR (epPCR) führte zu einer steigenden Anzahl an Mutationen im *hasA* Gen und damit zu einer Reduktion der aktiven Varianten in der Varianten-Bibliothek. Erfahrungswerte zeigen, dass in Bibliotheken mit ~50 % aktive Varianten mit hoher Wahrscheinlichkeit verbesserte Enzymvarianten aufgefunden werden. **26**

Abbildung 3.2.7: Vorläufige Charakterisierung der potentiellen Varianten (A6, B7, E11, E12, F5, G10, G12, G1, H2, H5, H7 und A11). Die synthetisierten HA-Polymere der Varianten zeigen entweder die gleiche (Varianten G1 und H2) oder eine reduzierte Syntheseleistung im Vergleich zum Wildtyp (WT). **27**

Abbildung 3.3.1: Übersicht der Arbeitspakete AP) zu den **Arbeitsprogrammen 5.3 und 5.5.** **29**

Abbildung 3.3.2: Aktivität von HasB in den vier Stämmen mit HasB und jeweils unterschiedlicher HA-Synthase. **30**

Abbildung 3.3.3: *In vitro* Aktivität der pro- und eukaryotischen HA-Synthasen. M: Generuler 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific), A, AB: HasA; hg: hgHAS2; gg: ggHAS2; xl: xlHAS2; WT: *S. cerevisiae* Stamm ohne Synthase. **30**

- Abbildung 3.3.4:** Lokalisation von szHasA (A) und xIHAS2 (B), überprüft durch C-terminale Fusion der Synthasen mit GFP. **31**
- Abbildung 3.3.5:** Modell für *E. coli* als HA-Produzent mit neuen Enzymmodulen aus AP 1 und AP2. **Grün:** native Enzyme. **Rot:** einzubringenden Enzyme; CscB: Sucrose permease; CscK: Fructokinase; GlmM: Phosphoglucosamin Mutase; GlmU: *N*-Acetylglucosamin-1-phosphat Uridyltransferase und Glucosamin-1-phosphat Acetyltransferase; HAS: HA-Synthase; NagA: *N*-Acetylglucosamin-6-phosphat Deacetylase; NagB: Glucosamin-6-phosphat Desaminase; NagK: *N*-Acetylglucosamin Kinase; NahK: *N*-Acetylhexosamine 1-Kinase; PTS: Phosphotransferase System; SuSy: Sucrose Synthase; Ugd: UDP-Glucose Dehydrogenase. **32**
- Abbildung 3.3.6:** Untersuchte HA-Synthasen aus Streptokokken. **34**
- Abbildung 3.3.7:** *In vitro* Aktivität von neuen HA-Synthasen exprimiert in *E. coli*. e: *S. equi* subsp. *equi*; i: *S. iniae*; p: *S. pyogenes*; u: *S. uberis*; .12, .25, .5, 1: Kommerzielle HA in verschiedenen Konzentrationen (0,12 bis 1 mg/mL); M: Generuler 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific). **34**
- Abbildung 3.4.1:** Übersicht der Arbeitspakete (AP) zum **Arbeitsprogramm 5.4**. **37**
- Abbildung 3.4.2:** Bestimmung der Konzentration mittels RI-Detektor (HA = 1,2 MDa). **38**
- Abbildung 3.4.3:** Bestimmung der Konzentration mittels RI-Detektor (HA = 2,1 MDa). **38**
- Abbildung 3.4.4:** Reproduzierbarkeit der GPC-Methode. Dreifachbestimmung 3 mg/mL 0,35 MDa HA mit 1 mL/min. **39**
- Abbildung 3.4.5:** Reproduzierbarkeit der GPC-Methode. Dreifachbestimmung 3 mg/mL 0,35 MDa HA mit 1 mL/min. **39**
- Abbildung 3.4.6:** Retentionszeiten der Peakmaxima in Abhängigkeit der HA-Molmasse (Methacrylatsäule, 30 cm). **40**
- Abbildung 3.4.7:** GPC-RI-DLS-Messung einer 1,75 MDa HA. Flussrate 0,35 mL/min; Temperatur 35 °C; HA-Konzentration 0,5 mg/mL; Standard PEO 1mg/ml; Dreifachdetektion (RI, RALS, LALS) rot: Brechungsindex; grün DLS-Signal 90°, schwarz DLS 7°. **41**
- Abbildung 3.4.8:** Bestimmung der Molmasse von HA-Standards und Proben der RWTH-Aachen. Rot markiert sind die Abweichungen zu den Herstellerangaben. **41**
- Abbildung 3.4.9:** Chromatogramm einer HA-Probe des Projektpartners RWTH Aachen (Molmasse 2,5 MDa). **42**
- Abbildung 3.4.10:** Agarosegel von Hyaluronsäure-Produkten (Kettenlänge nach Herstellerangaben) **43**
- Abbildung 3.5.1:** Stoffstromnetz zur Berechnung der LCA von HA, Szenario Extraktion aus Hahnenkamm. Da es sich um ein umfangreiches Modell handelt wurde ein Bereich aus "Stage V" zur besseren Ansicht vergrößert. **46**
- Abbildung 3.5.2:** Stoffstromnetz zur Berechnung der LCA von HA, Szenario "Fermentation (*Streptococcus*) mit chemischer Quervernetzung der HA (*crosslinking*)". Dieses Szenario ist hierarchisch aufgebaut. Der dunkel eingefärbte Prozess bspw. beinhaltet einen weiteren Netzteil: Die Aufreinigung mit mehreren Filtrierungsschritten (1 und 2, *Cross-Flow Filtration*), Sterilisation (St) und Gefriertrocknung (Gt). **47**
- Abbildung 3.5.3:** Die Ergebnisse (berechnet mit dem Bewertungssystem ReCiPe Midpoint) der Szenarien im Vergleich als sogenannter Fingerprint. Bei dieser Darstellungsart wird jeweils der höchste Wert einer Wirkungskategorie auf den Wert 1 normalisiert. Links die Ergebnisse für alle Szenarien mit einer logarithmischen Skalierung der Achse. Auf der linken Abbildung finden sich nur die Fermentationsszenarien im Vergleich untereinander, die Achse ist linear skaliert. **47**
- Abbildung 3.5.4:** Die Bewertungsergebnisse der Fermentationsszenarien mit dem Bewertungssystem ReCiPe Endpoint (H,A). **48**

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.3.1: Analyse der synthetisierten HA aus dem Kulturmedium von *Lactococcus lactis*. Es wurden HA-Synthasen aus verschiedenen *Streptococcus* Stämmen des Referenzzentrums für Streptokokken des Uniklinikums Aachen getestet (durch Partner iAMB). Die Analyse des Molekulargewichts der HA erfolgte mit GPC (am IITM). **38**

Tabelle 3.4.1: Zusammenfassung der Ergebnisse. Der Soll-Wert bezieht sich auf die Herstellerangaben. **45**

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AP	Arbeitspaket
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>arbitrary unit</i>
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
Cys	Cystein
DLS	dynamische Lichtstreuung
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
epPCR	<i>Error-prone PCR</i> , fehlerhafte PCR
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GlcA	Glucuronsäure
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
GlmU	Glucosamin-1-Phosphate Acetyltransferase / <i>N</i> -Acetylglucosamin-1-Phosphat Uridyltransferase
GPC	Gelpermeationschromatographie
GRAS	<i>generally-regarded-as-safe</i>
HA	Hyaluronan, Hyaluronsäure
HAS	Hyaluronan-Synthase
His	Histidin
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
kb	Kilobase
KMU	Kleine und mittlere Unternehmen
LALS	<i>low-angle light scattering</i>
LC	<i>light scattering</i> , Lichtstreuung
LCA	<i>life cycle assessment</i> , Lebenszyklusanalyse
LPS	Lipopolysaccharid
MnCl ₂	Mangan(II)-chlorid

MP-CE	Multiplexed-Kapillarelektrophorese
Mw	Molekulargewicht, molekulare Masse
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form
NahK	<i>N</i> -Acetylhexosamine 1-Kinase (GlcNAc-1-Kinase)
NOX	NADH-Oxidase
PABA	<i>para</i> -Aminobenzoesäure
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PDI	Polydispersitätsindex
PEO	Polyethylenglycol
PEP	Phosphoenolpyruvat
PK	Pyruvatkinase
PMB	Polymyxin B
PPase	Pyrophosphatase
RALS	<i>right-angle light scattering</i>
RI	<i>refractive index</i> , Brechungsindex
SEC	<i>size exclusion chromatography</i> , Größenausschluss-Chromatographie
SeSaM	<i>sequence saturation mutagenesis</i>
SuSy	sucrose synthase, Saccharose Synthase
UDP	Uridindiphosphat
UDP-Glc	Uridindiphosphat-Glucose
UDP-GlcA	Uridindiphosphat-Glucuronsäure
UDP-GlcNAc	Uridindiphosphat- <i>N</i> -Acetylglucosamin
UGDH	UDP-Glucose-Dehydrogenase
UMP	Uridinmonophosphat
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp

Projektkennblatt der Deutschen Bundesstiftung Umwelt					
Az	30812	Referat	32	Fördersumme	484.723,-
Antragstitel		Entwicklung eines nachhaltigen biotechnologischen Verfahrens zur Herstellung definierter Hyaluronsäure-Polymere für die Biomedizin HYALURONAN-Polymer			
Stichworte					
Laufzeit		Projektbeginn		Projektende	
3 Jahre 2 Monate		01.06.2013		31.08.2016	
Abschlussberichte		Abschlussbericht		06.2013 – 08.2016	
Bewilligungsempfänger		RWTH Aachen University		Tel 0241-80-24176/28350	
		Lehr- und Forschungsgebiet Biomaterialien, Institut für Biotechnologie und Helmholtz-Institut für Biomedizinische Technik, Worringer Weg 1, 52074Aachen (Biomat)		Fax 0241-80-22387	
				Projektleitung	
				Prof. Dr. Lothar Elling	
				Bearbeiter	
				Sokr.: Frau Anita Modigell	
Kooperationspartner		RWTH Aachen University, Lehrstuhl für Biotechnologie, Institut für Biotechnologie, Worringer Weg 1, 52074 Aachen (Biotec) RWTH Aachen University, Lehrstuhl für Angewandte Mikrobiologie, Institut für Angewandte Mikrobiologie, Worringer Weg 1, 52074 Aachen (iAMB) GALAB Laboratories GmbH (GALAB), Neue Adresse: Am Schleusengraben 7 D-21029 Hamburg IFU, Hamburg (Unterauftrag)			
<small>Deutsche Bundesstiftung Umwelt • An der Bornau 2 • 49090 Osnabrück • Tel 0541/9633-0 • Fax 0541/9633-190 • http://www.dbu.de</small>					

1. Zusammenfassung (Kurzfassung des Berichts)

Im Projekt HYALURONAN-Polymer wurde die Entwicklung eines nachhaltigen biotechnologischen Verfahrens zur Herstellung definierter Hyaluronsäure-Polymere für die Biomedizin bearbeitet. Im Arbeitsprogramm 5.1 wurde die Analytik für die schnelle Optimierung der Enzymmodulsysteme für die *in vitro* Synthese von UDP-GlcA, UDP-GlcNAc und Hyaluronsäure (HA) mit der HA-Synthase aus *Pasteurella multocida* (pmHAS) etabliert. Mit der Multiplexed-Kapillarelektrophorese war es erstmals möglich, die Substrate und Edukte in Abhängigkeit verschiedener Reaktionsparameter während der Synthese der HA zu analysieren. Schließlich konnte durch Kombination der Enzymmodulsysteme die *in vitro* Synthese von HA mit einem Molekulargewicht von >2,5 MDa ausgehend von *N*-Acetylglucosamin und Saccharose gezeigt werden. Im Arbeitsprogramm 5.2 wurden drei Expressionssysteme für die bakterielle Hyaluronan (HA)-Synthase aus *Streptococcus equi* subsp. *zooeconomicus* (szHAS) etabliert und die Agarose-Gelelektrophorese als Hochdurchsatzdurchmusterungssystem zur Analyse des Molekulargewichts der HA validiert. Mit unterschiedlichen Methoden der Gelenkten Evolution (Sättigungsmutagenese mit OmniChange, epPCR) wurden Mutantenbibliotheken erstellt. Keine der Enzymvarianten der szHAS zeigte HA Polymere mit einer Molmasse >2 MDa. Es wurde festgestellt, dass die Agarosegel-Elektrophorese für die Detektion von hochmolekularer HA limitiert ist und andere Methoden als Hochdurchsatzdurchmusterungssysteme entwickelt werden sollten. Mit dem etablierten System ist es allerdings möglich Enzymvarianten für die Synthese von kurzkettiger HA zu analysieren. Kurzkettige HA ist neben der angestrebten hochmolekularen HA ebenfalls für biomedizinische Anwendungen interessant. Im Arbeitsprogramm 5.3 zeigten umfangreiche Versuche zur Etablierung einer HA-produzierenden Bäckerhefe, dass eukaryotische HA-Synthasen (Hahn, Krallenfrosch und Nacktmull) nicht aktiv exprimiert werden können. Die bakterielle HA-Synthase (szHAS) war im Zellextrakt aktiv, zeigte jedoch eine Lokalisation im Zellinneren anstatt an der äußeren Zellmembran. Als alternatives Expressionssystem wurde in Kooperation mit einer indischen Arbeitsgruppe *Lactococcus lactis* etabliert. Mit diesem war es möglich, neue HA-Synthasen aus einer Sammlung klinischer Isolate des nationalen Referenzzentrums für Streptokokken am Universitätsklinikum Aachen zu identifizieren. Diese Arbeiten bilden die Basis für zukünftige Laborfermentationen im größeren Maßstab und für die Aufarbeitung von HA. Mindestens zwei HA-Synthasen zeigten in Laborfermentationen die Bildung von hochmolekularer HA (>2 MDa). Im Arbeitsprogramm 5.4 wurde die präzise Bestimmung der Molmasse und Molmassenverteilung (Polydispersionsindex, PI) von hochmolekularer HA mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) mit einem Malvern Viscotek TDA305 System (RI, LALS, RALS) etabliert. Die Detektion mittels Brechungsindex (RI) und Lichtstreuung (LS) aus verschiedenen Winkeln (right angle RA, left angle LA) macht die Kalibrierung und Validierung einer GPC Säule auf der Basis eines Methacrylatpolymers möglich. Erstmals wurden Proben aus der *in vitro* HA Synthese analysiert und festgestellt, dass HA mit einer Molmasse von 2,5 MDa und einem PI von 1,06 vorliegt. Die ökobilanzielle Bewertung ergab, dass der zurzeit industriell verwendete Prozess zur Herstellung hochmolekularer HA durch Extraktion aus Hahnenkämmen klare Nachteile gegenüber den fermentativen Prozessen zeigt. Industriell etablierte Fermentationsprozesse mit *Streptococcus equi* subsp. *zooeconomicus* produzieren allerdings keine hochmolekulare HA. Das industriell verwendete Verfahren zur Herstellung von hochmolekularer HA mittels chemischer Vernetzung (*crosslinking*) wird ebenfalls in der Ökobilanz als nachteilig bewertet. Die erste ökobilanzielle Analyse einer Fermentation mit *Lactococcus lactis* zeigt Vorteile in allen Bereichen der Ökobilanz. Für alle Fermentationen wird festgestellt, dass sich die *cross-flow* Filtration als Prozessschritt der HA Aufarbeitung

wegen des intensiven Wasser- und Energiebedarfs nachteilig auf die ökobilanzielle Bewertung auswirkt. Für die Verwertung der erzielten Ergebnisse bleibt festzuhalten, dass die *in vitro* Synthese zur Herstellung von hochmolekularer HA prinzipiell geeignet ist. Die Projektpartner werden dieses Thema in einem vom BMBF geförderten Anschlussprojekt weiter bearbeiten. Ebenso wird die Nutzung der neuen HA-Synthasen in *Lactococcus lactis* mit dem indischen Kooperationspartner weiter verfolgt.

2. Bericht

2.1 Zielsetzung und Anlass des Vorhabens

Das Ziel des Projektes war die Entwicklung eines neuartigen, integrierten und nachhaltigen Technologiekonzepts für die biotechnologische Herstellung von monodispersen Polymeren der Hyaluronsäure (HA) mit einer Molmasse von ≥ 2 MDa für biomedizinische Anwendungen. Hochmolekulare HA-Polysaccharide werden zurzeit durch Extraktion aus Hahnenkämmen oder Fermentationen von pathogenen Streptokokken-Stämmen gewonnen. Die Projektpartner aus der RWTH Aachen und die Fa. GALAB GmbH setzten sich als Ziel, ein Konzept zur nachhaltigen und umweltentlastenden Produktion von hochmolekularer HA zu erstellen.

In Bezug auf die Nachhaltigkeit des Prozesses und Entlastung der Umwelt sollten folgende potentiellen Vorteile eines solchen Prozesses bewertet werden:

- Vermeidung von tierischen Geweben/(pathogenen) Bakterien als Quelle von Wirkstoffen
- Geringer Energieverbrauch durch hohe Raum-Zeit-Ausbeute in kleinen Reaktor Volumina
- Keine Abtrennung/Inaktivierung von tierischen Proteinen/bakteriellen Toxinen notwendig
- Verringerung des Verbrauchs an organischen Lösungsmitteln durch hohe, einstellbare Produktkonzentration und Aufreinigung aus einem Minimalmedium
- Hohe und konstante Qualität des Produktes durch Unabhängigkeit von Umwelteinflüssen
- Einfache Produktion und Genehmigung des Verfahrens durch Wahl des industriell etablierten Wirtes *Saccharomyces cerevisiae*
- Nach erfolgreicher Markteinführung einfache Möglichkeit auf schwankende oder steigende Nachfrage zu reagieren

2.2 Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Durch die Integration verschiedener Expertisen und Technologien aus den Bereichen des Biocatalytical Engineering (BioMat), Protein Engineering (BioTec), Metabolic Engineering (iAMB), Production and Downstream Engineering (GALAB) sollte ein Verfahren für die nachhaltige Produktion von HA-Polymeren (≥ 2 MDa) als pharmazeutischer Wirkstoff mit hohem Marktpotenzial entwickelt werden. Die ökobilanzielle Bewertung sollte durch die ifu hamburg GmbH erfolgen (**Abb. 2.2.1**).

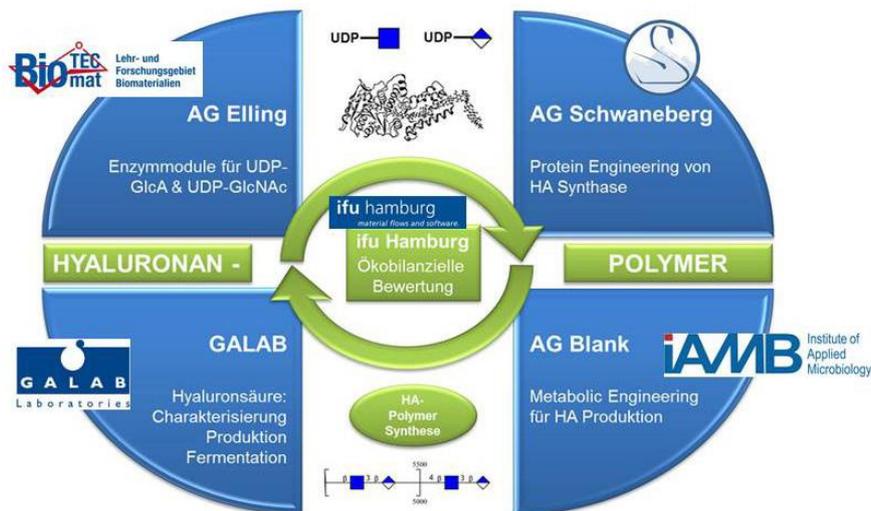


Abbildung 2.2.1: Projektübersicht mit Kooperationspartnern.

Die Aufgabe der Projektpartner war die Entwicklung eines optimierten Produktionsstammes der Bäckerhefe zur Herstellung von HA-Polymeren unter kontrollierten Kultivierungsbedingungen. Dazu wurden geeignete HA-Synthasen (HAS) gezielt selektiert, die eine gute Syntheseleistung an polymerer HA (≥ 2 MDa) in der rekombinanten Bäckerhefe zeigen. Mittels evolutivem und semi-rationalem Protein-Engineering sollte eine HAS für die HA-Polymerbildung mit hoher Kettenlänge optimiert und ein Durchmusterungssystem im 96-Mikrotiterplattenformat etabliert werden. Parallel dazu wurden neue Enzymmodule für den „kurzen“ metabolischen Zugang der Nukleotidzucker UDP-GlcA und UDP-GlcNAc entwickelt und für die *in vitro* Synthese von HA Polymeren mit HA-Synthasen kombiniert. Schließlich sollte ein Verfahren zur fermentativen Produktion an langkettigen HA-Polymeren mit integrierter Produktaufarbeitung und -analytik zur Reduktion der Umweltbelastung etabliert werden.

3. Ergebnisse, Diskussion und Fazit

3.1. Arbeitsprogramm 5.1 (AG Elling): Enzymmodule für die Synthese von UDP-GlcA und UDP-GlcNAc zur Synthese von HA Polymeren

Ziel des Arbeitsprogramms 5.1 war es, *in vitro* neue metabolische Wege für die Synthese von HA zu etablieren, die als Vorbild für das Metabolic Engineering (Arbeitsprogramm 5.3) dienen sollten. Hierzu wurden rekombinante Enzyme zu neuartigen Enzymmodulsystemen kombiniert, die ausgehend von den nachhaltigen Rohstoffen Saccharose und GlcNAc über kurze synthetische Wege in einer Eintopfreaktion HA Polymere liefern sollten (**Abb. 3.1.1**).

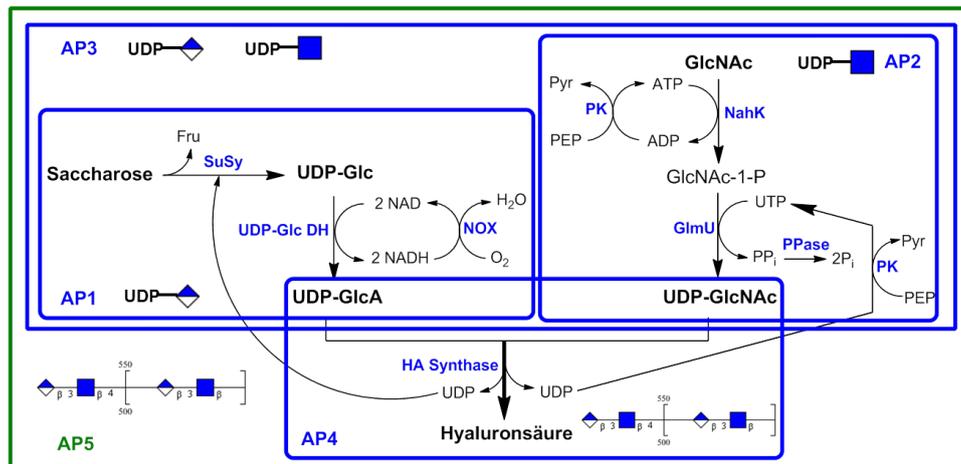


Abbildung 3.1.1: Enzymmodule für die HA Synthese: UDP-GlcA-Modul, UDP-GlcNAc-Modul und HAS-Modul mit integrierten Nucleotidzucker Regenerationssystemen.

Schließlich sollte das Arbeitsprogramm 5.1 in einer optimierten *in vitro* HA Synthese HA Polymere liefern, die als Standards für die Validierung der Analytik (Arbeitsprogramm 5.4) der HA Synthese mit ganzen Zellen dienen. Mit der direkten Nutzung von Saccharose und GlcNAc sowie der integrierten Regeneration der Nucleotidzucker sind die Enzymmodule energetisch weniger aufwendig als die nativen metabolischen Wege und basieren außerdem auf nachwachsenden Rohstoffen (Arbeitsprogramm 5.5).

Die enzymatischen Reaktionen wurden sowohl einzeln als auch in Modulkombinationen umfassend charakterisiert und optimiert. Für die Analytik der HA Synthese wurde erstmalig ein ganzheitliches Verfahren angewendet, bei dem alle Substrate und Produkte erfasst wurden [1]. Mittels Multiplexed-Kapillarelektrophorese (MP-CE) wurde erfolgreich eine Trennmethode entwickelt, die die Analyse und Quantifizierung aller Nucleotide und Nucleotidzucker des Reaktionsgemisches mit UV-Detektion ermöglicht (**Abb. 3.1.2**).

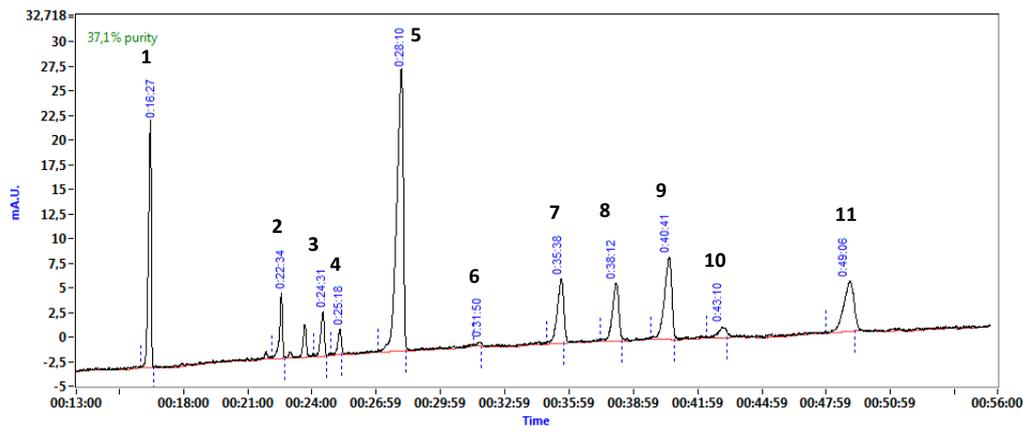


Abbildung 3.1.2: MP-CE Elektropherogramm einer kombinierten Synthese von UDP-GlcA und UDP-GlcNAc mit Trennung und Detektion aller Nukleotide und Nukleotidzucker. 1. NAD⁺, 2. NADH, 3. UDP-GlcNAc, 4. UDP-Glc, 5. PABA (interner Standard), 6. UMP, 7. ADP, 8. UDP-GlcA, 9. ATP, 10. UDP, 11. UTP.

Mit der MP-CE war es nun erstmals möglich, die Enzymmodulsysteme zur HA Synthese systematisch im 96er-Mikrotiterplattenformat zu analysieren und damit eine schnelle Optimierung der Reaktionsbedingungen durchzuführen. Das HA Polymer wurde in Agarose-Gelen mit anschließender *stains-all*-Färbung zur qualitativen Analyse der molekularen Masse (Mw) separiert und dessen Konzentration mit der CTAB-Trübungsmethode bestimmt. Alle Enzymmodule wurden im 10 mM Maßstab optimiert. Nachfolgend werden die Ergebnisse der Arbeitspakete einzeln vorgestellt.

3.1.1 Arbeitspaket 1 (AP1)

Die Aufgabe im AP1 war die Entwicklung und Optimierung eines Saccharose/UDP-GlcA Enzymmoduls sowie die Synthese von UDP-GlcA. Die Enzym-Gene sollten an die AG Blank (Arbeitsprogramm 5.3) zur weiteren Verwendung im Metabolic Engineering übergeben werden.

Ergebnisse: Das UDP-GlcA-Modul (**AP1 in Abb. 3.1.1**) wurde mit den rekombinanten Enzymen Saccharose Synthase (SuSy) aus Kartoffel, einer bisher unveröffentlichten UDP-Glc-Dehydrogenase (szUGDH) aus dem HA-Produzenten *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* und NADH-Oxidase (NOX) aus *Lactobacillus brevis* erfolgreich etabliert. Die einzelnen Enzyme wurden charakterisiert und das Enzymmodul hinsichtlich Enzym-, Substratmengen, pH-Optimum und Metallionenabhängigkeit optimiert. Ein Umsatz von 95% lässt sich nach 4 h bei leicht basischem pH erzielen.

Diskussion: Damit wurde mit der UGDH aus *Streptococcus* ein neuartiges Enzymmodulsystem etabliert, das den nachwachsenden Rohstoff Saccharose für die Synthese von UDP-GlcA nutzt. Die Gene sowie Enzymdaten wurden der AG Blank zur Verfügung gestellt.

Fazit: Das Enzymmodulsystem zur Synthese von UDP-GlcA ist durch die Nutzung von Saccharose auch ökonomisch interessant, da es hier den sehr teuren Nukleotidzucker UDP-GlcA (1g kosten ca. 1500,- € bei Merck) aus einem preiswerten Rohstoff liefert. Die gewählte Enzymkombination ist ebenfalls vorteilhaft im Hinblick auf die Ökonomie der *in vitro* HA Synthese. Durch das Enzym SuSy wird die direkte Nutzung von UDP aus der Reaktion der HA-Synthese für die Regeneration von UDP-GlcA realisiert, so dass ein Teil der HA Synthese nun auf Saccharose basiert (**Abb. 3.1.1**). Im Vergleich zum UDP-GlcNAc Modul (**AP2 in Abb. 3.1.1**) ist es allerdings, trotz optimierter Bedingungen, wesentlich langsamer.

Eine Alternative wäre die Kombination aus einer Kinase und Pyrophosphorylase nach dem Vorbild eines *salvage pathways*, der von Glucuronsäure (GlcA) ausgeht. Entsprechende Enzyme, eine GlcA-Kinase und UDP-GlcA-Pyrophosphorylase, sind in der Literatur beschrieben [2-4].

3.1.2 Arbeitspaket 2 (AP2)

Die Aufgabe im AP2 war die Entwicklung und Optimierung eines GlcNAc/UDP-GlcNAc Enzymmoduls sowie die Synthese von UDP-GlcNAc. Die Enzym-Gene sollten an die AG Blank (Arbeitsprogramm 5.3) zur weiteren Verwendung im Metabolic Engineering übergeben werden.

Ergebnisse: Das UDP-GlcNAc-Modul wurde mit den Enzymen GlcNAc-1-Kinase (NahK) aus *Bifidobacterium longum*, einer bisher unveröffentlichten UDP-GlcNAc-Pyrophosphorylase (szGlmU) aus *S. zooepidemicus* und einer kommerziellen Pyrophosphatase (PPase) erfolgreich etabliert (**AP2 in Abb. 3.1.1**). Die einzelnen Enzyme wurden charakterisiert und das Enzymmodul hinsichtlich Enzymmengen, pH-Optimum, Metallionenabhängigkeit und möglicher ATP- bzw. UTP- Regeneration mittels PEP/PK optimiert (**Abb. 3.1.1**). NahK und szGlmU besitzen hohe volumetrische Aktivitäten und breite Optima, was deren Einsatz unter einer Vielzahl von Reaktionsbedingungen ermöglicht. Die Synthese wurde für einen Umsatz von 95% in 1 h Reaktionsdauer bei neutralem pH-Wert optimiert. Durch leichte Erhöhung der Enzymmengen lässt sich dieser Umsatz auch in kürzerer Zeit erreichen.

Diskussion: Damit wurde mit der szGlmU ein neuartiges Enzymmodulsystem etabliert, das den nachwachsenden Rohstoff *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) für die Synthese von UDP-GlcNAc nutzt. GlcNAc kann durch Hydrolyse aus dem Polysaccharid Chitin (Abfallstoff bei der industriellen Verarbeitung von marinen Krustentieren) gewonnen werden. Die Gene sowie Enzymdaten wurden der AG Blank zur Verfügung gestellt.

Fazit: Die Kombination von NahK und szGlmU eignet sich sehr gut für eine effiziente *in vitro* Synthese von UDP-GlcNAc. Das Enzymmodulsystem zur Synthese von UDP-GlcNAc ist durch die Nutzung von *N*-Acetylglucosamin auch ökonomisch interessant, da es hier den sehr teuren Nucleotidzucker UDP-GlcNAc (1g kosten ca. 1400,- € bei Merck) aus preiswerten Vorstufen liefert.

3.1.3 Arbeitspaket 3 (AP3)

Die Aufgabe im AP3 war die kombinierte Synthese von UDP-GlcA und UDP-GlcNAc sowie die Synthese von Hyaluronan (HA) hinsichtlich der Verhältnisse der beiden Nucleotidzucker. Die Ergebnisse sollten mit der AG Blank hinsichtlich einer Modellierung der Nucleotidzucker Biosynthese in rekombinanten Produktionsstämmen diskutiert werden.

Ergebnisse und Diskussion: Um den Einfluss des Verhältnisses der beiden Nucleotidzucker auf die Polymerisationsreaktion zu untersuchen, wurden zunächst äquimolare Konzentrationen der beiden Nucleotidzucker für die HA-Synthese mit einer Hyaluronan Synthase (HAS) untersucht (**AP4 in Abb. 3.1.1**). Weiterhin wurden die Nucleotidzuckermodule aus AP1 und AP2 in direkter Kombination mit HAS getestet (**AP5 in Abb. 3.1.1**). Für die *in vitro* Applikation wurde die HA-Synthase aus *Pasteurella multocida* (pmHAS) gewählt. pmHAS gehört zur HAS-Klasse II und ist als einzige HA-Synthase durch Entfernen der Membranassoziationsdomäne erfolgreich als lösliches Enzym exprimiert worden [5]. Für die projektbezogene Anwendung wurde das Enzym mit einem His-Tag ausgerüstet und ein effizientes Expressions- und Aufreinigungsverfahren entwickelt, das eine schnelle Bereitstellung der pmHAS ermöglicht. Für die Analyse der pmHAS Reaktion wurde ein neuartiges kombiniertes Analytikverfahren etabliert: die Reaktion wird einerseits über die

Bildung des Ko-produktes UDP und über die gleichzeitige Abnahme der Substrate UDP-GlcA und UDP-GlcNAc mittels MP-CE verfolgt, und andererseits wird die Bildung des Polymerprodukts auf Agarose-Gelen untersucht (Arbeitsprogramm 5.2). **Abbildung 3.1.3** zeigt, dass der Anstieg der UDP-Bildung mit dem Anstieg der Polymerbildung bei unterschiedlichen äquimolaren Konzentrationen von UDP-GlcNAc und UDP-GlcA korreliert.

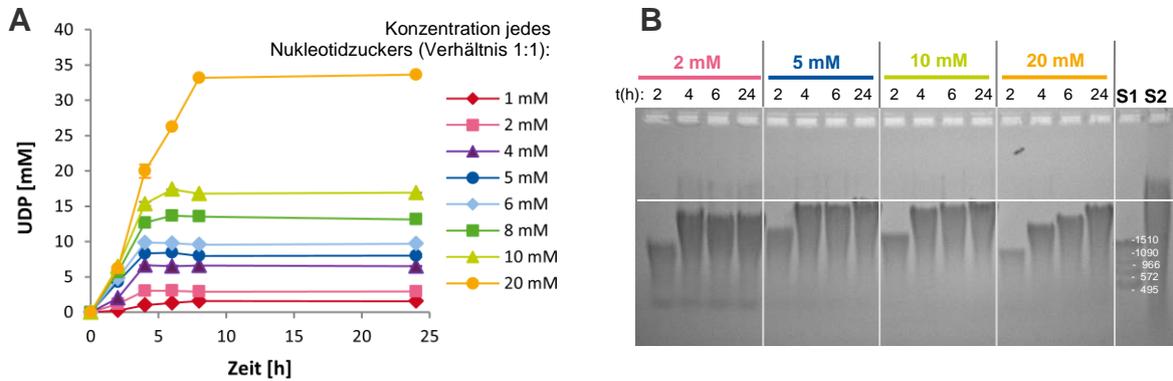


Abbildung 3.1.3: Einfluss der Substratkonzentration auf die pmHAS-Reaktion bei einem Verhältnis der beiden Nukleotidzucker von 1:1. **A:** Analyse der UDP-Bildung mittels MP-CE Analytik. **B:** Analyse der HA-Bildung auf Agarose-Gelen mit *stains-all* Färbung; dargestellt ist die HA-Polymer Bildung nach unterschiedlichen Reaktionszeiten. Kommerzielle HA Proben dienten als Standards (S): S1: Select-HA HiLadder™ (Hyalose LLC), Mw = 495, 572, 966, 1090, 1510 kDa (0,6 µg); S2: hochmolekulare HA (Contipro Biotech), Mw ≥ 2 MDa (4 µg).

Mithilfe der kombinierten Analytik wurde die pmHAS Reaktion bzw. das HAS-Enzymmodul (**AP4 in Abb. 3.1.1**) über die Literaturdaten hinaus charakterisiert und optimiert. So konnte die Synthesedauer bei äquimolarem Substratverhältnis (bis 20 mM Nukleotidzucker) von 48 - 72 h [6] auf 8 h verkürzt werden (**Abb. 3.1.3A**). Proben dieser Synthesen (mit je 10 mM Nukleotidzucker) wurden zur Analyse an GALAB weitergegeben (Arbeitsprogramm 5.4). Die Analyse mit Gelpermeationschromatographie ergab nach 24 h Synthese eine molekulare Masse von 2,5 MDa mit einem Polydispersion-Index von 1,06. Im Vergleich zu publizierten Daten mit 1,8 MDa [6] wurde in diesem Projekt *in vitro* eine höhere molare Masse erzielt; Angaben zum PDI sind nicht publiziert.

Bei der Untersuchung der Nukleotidzuckerhältnisse auf die pmHAS Reaktion konnten ebenfalls neue Erkenntnisse gewonnen werden. So stellte sich heraus, dass ein Überschuss an UDP-GlcNAc gegenüber UDP-GlcA die Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zum äquimolaren Verhältnis deutlich erhöht, während ein Unterschuss an UDP-GlcNAc die Reaktionsgeschwindigkeit verlangsamt (**Abb. 3.1.4**).

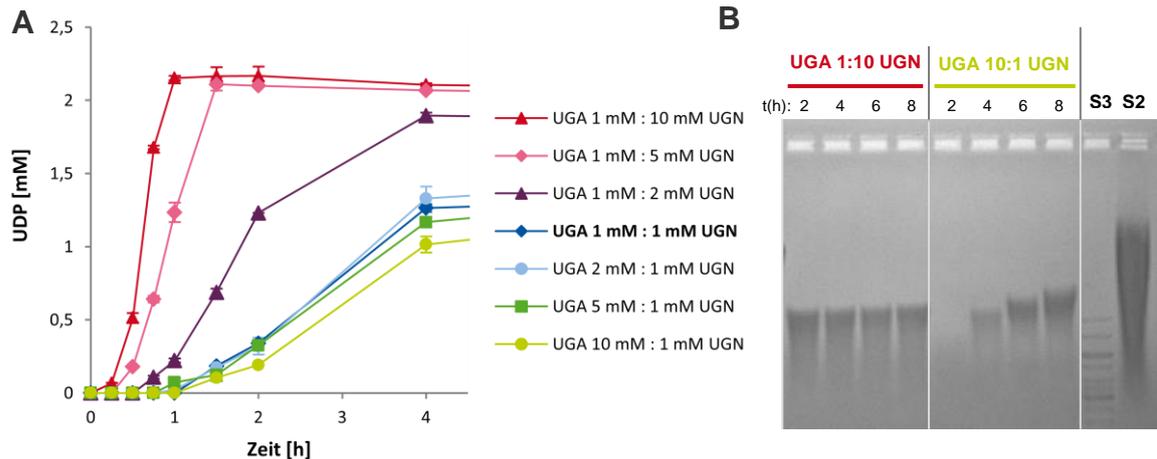


Abbildung 3.1.4: Einfluss unterschiedlicher Verhältnisse der Nucleotidzucker auf die pmHAS-Reaktion. **A:** Analyse der UDP-Bildung mittels MP-CE Analytik, Ausschnitt aus den ersten 4 h. **B:** Analyse der HA-Bildung auf Agarose-Gelen mit *stains-all* Färbung beispielhaft für ein UDP-GlcA/UDP-GlcNAc Verhältnis von 1:10 und 10:1. UDP-GlcA = UGA, UDP-GlcNAc = UGN. Standards: S2: hochmolekulare HA (Contipro Biotech), Mw \geq 2 MDa (4 μ g); S3: DNA 1 kb Leiter, Mw 0,25-10 kb.

Weiterhin wird die Bildung von UDP und HA unabhängig von der UDP-GlcA Konzentration verzögert, wenn sich UDP-GlcNAc im Unterschuss zur UDP-GlcA befindet. Wir schließen daraus, dass die UDP-GlcNAc Konzentration der limitierende Faktor für die Geschwindigkeit der HA Polymerisation ist. Aus dem Vergleich in **Abb. 3.1.4B** lässt sich schließen, dass bei sehr hohem Überschuss an UDP-GlcNAc die HA Menge und Bildungsrate schneller ist; bei hohem Überschuss an UDP-GlcA ist die Bildungsrate und die Polymermenge deutlich niedriger. Durch die geringere HA-Polymermenge ergibt sich durch die nicht-prozessive HAS eine leicht erhöhte Polymergröße.

In den folgenden Untersuchungen wurden die Nucleotidzucker durch entsprechende Enzymmodule ersetzt. **Abbildung 3.1.5** zeigt das Ergebnis dieser Kombination (**AP1, AP2 und AP4 in Abb. 3.1.1**) in einer Eintopfreaktion ausgehend von UDP-Glc im UDP-GlcA Modul. Durch die MP-CE Analytik lassen sich alle Nucleotide und Nucleotidzucker des Enzymmodulsystems verfolgen und deren Konzentrationen sowie das Verhältnis zu jedem Reaktionszeitpunkt bestimmen.

Hier zeigt sich ein Konzentrationsverlauf von gebildeter UDP-GlcA und UDP-GlcNAc, der zu jedem Zeitpunkt der Reaktion ein Verhältnis der Nucleotidzucker einstellt. Auffallend ist, dass die Polymersynthese (UDP-Bildung in **Abb. 3.1.5A** und HA-Bildung **Abb. 3.1.5B**) sehr stark verzögert startet, obwohl die UDP-GlcNAc Synthese sehr schnell und die Bildung von UDP-GlcA leicht verzögert verläuft. Ein starker Überschuss an UDP-GlcNAc wird nicht erreicht. Wir schließen daraus, dass die Kombination der Enzymmodule für die Synthese der Nucleotidzucker eine Einstellung der Konzentrationsverhältnisse erfordert (siehe AP5).

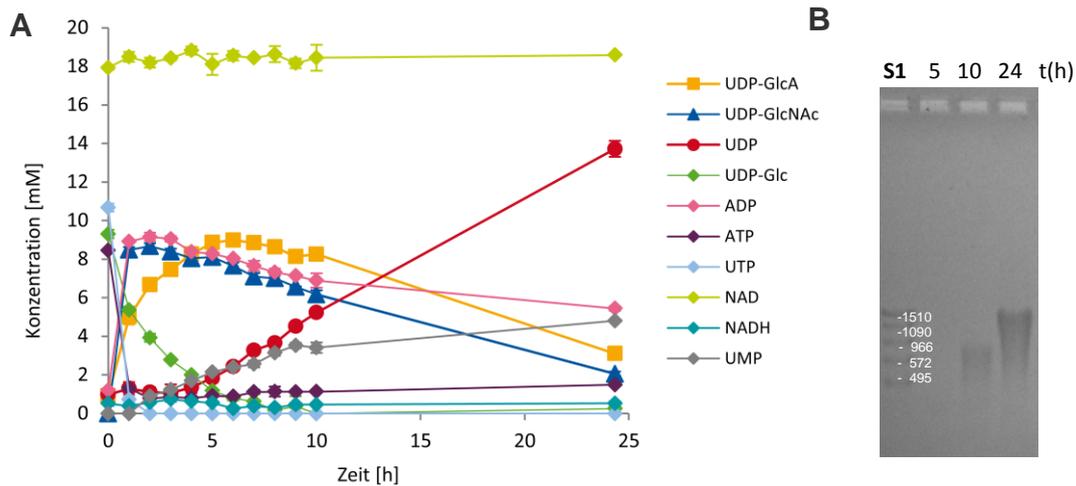


Abbildung 3.1.5: Kombination der Enzymmodule für UDP-GlcA (AP1) und UDP-GlcNAc (AP2) mit dem HAS-Modul (AP4). Die Reaktion wurde ausgehend von UDP-Glc und GlcNAc gestartet, der Reaktionsansatz beinhaltete dabei 10 mM UDP-Glc, 20 mM NAD⁺, 10 mM GlcNAc, 10 mM ATP und 10 mM UTP. **A:** Verlauf der Konzentration aller Nucleotid-Edukte/Produkte des Enzymmodulsystems mittels MP-CE-Analytik. **B:** zugehöriges Agarose-Gel mit *stains-all* Färbung. S1: Select-HA HiLadder™ (Hyalose LLC), Mw = 495, 572, 966, 1090, 1510 kDa (0,6 µg).

Meilenstein 1 (MS1): Enzymmodule für Saccharose/UDP-GlcA und GlcNAc/UDP-GlcNAc etabliert und kombinierte *in vitro* Synthese von UDP-GlcA und UDP-GlcNAc

Der Meilenstein 1 wurde erreicht. Die *in vitro* HA Eintopfsynthese mit kombinierten Enzymmodulen und pmHAS wurde erfolgreich etabliert. Eine kleine Testmenge von *in vitro* synthetisierter HA wurde an den Projektpartner GALAB zur Analytik des Molekulargewichts und der Polydispersität weiter gereicht (siehe auch MS2).

Fazit: Die Enzymmodule für beide Nucleotidzucker wurden direkt mit der löslichen HA-Synthase pmHAS verknüpft, die sich besonders gut für eine *in vitro* Anwendung eignet. Mit der in AP3 etablierten Analytik, bestehend aus MP-CE und Agarose-Gelen, lässt sich die pmHAS Reaktion umfassend untersuchen. Neben der Bestimmung der Syntheserate lässt sich damit auch das Verhältnis der Nucleotidzuckerkonzentrationen über die Zeit verfolgen.

3.1.4 Arbeitspaket 4 (AP4)

Die Aufgabe im AP4 war die Optimierung der Reaktionsbedingungen von rekombinanten, verbesserten HA-Synthasen von AG Schwaneberg (Arbeitsprogramm 5.2) sowie die Untersuchung des Einflusses des UDP-GlcA/UDP-GlcNAc Verhältnisses auf die HA Polymergröße. Die Ergebnisse sollten mit der AG Blank hinsichtlich einer Modellierung der Nucleotidzucker Biosynthese in rekombinanten Produktionsstämmen diskutiert werden.

Ergebnisse: Eine Herausforderung bei der Untersuchung der von der AG Schwaneberg genutzten Streptokokken-Synthasen (*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* HAS, szHAS) war die Tatsache, dass sich diese nur aufwendig als Membranfraktion isolieren lassen und für die Aktivität und Stabilität bestimmte Lipid-Faktoren benötigen [7]. Auf der Basis der Ergebnisse des AP3 wurden anstatt aufgereinigter HA-Synthase HAS-haltiges Zell-Lysat bzw. permeabilisierte Zellen mit UDP-GlcA und UDP-GlcNAc inkubiert. Dazu wurden rekombinante *E. coli*-Zellen, die szHAS oder pmHAS (Kontrolle) exprimieren, entweder durch Ultraschall aufgeschlossen (Zell-Lysat) oder mit dem Tensid Tween20 oder Polymyxin B (PMB) permeabilisiert (**Abb. 3.1.6**).

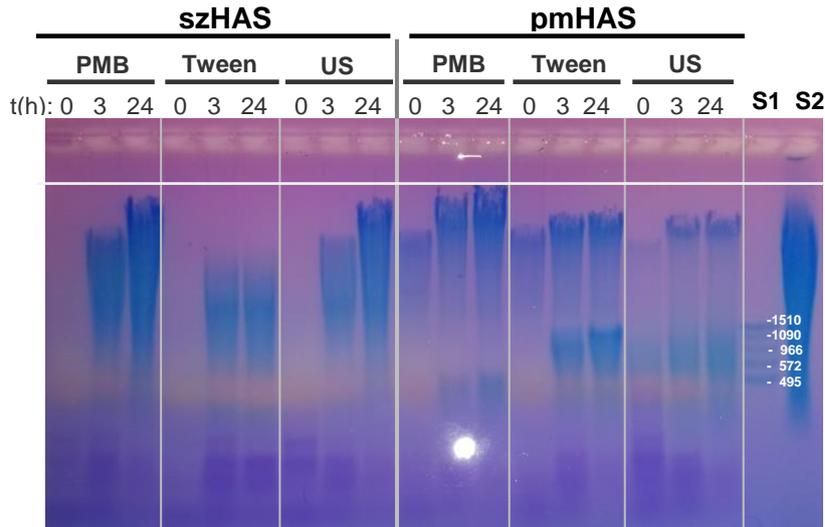


Abbildung 3.1.6: Vergleich der Aufschluss- bzw. Permeabilisierungsmethoden für die HA Synthese mit *E. coli* Zell-Lysat bzw. permeabilisierten *E. coli* Zellen. Agarose-Gel mit *stains-all* Färbung. Der Reaktionsansatz startete mit 5 mM UDP-GlcA und 5 mM UDP-GlcNAc. PMB = Polymyxin B, US = Ultraschall. S1: Select-HA HiLadder™ (Hyalose LLC), Mw = 495, 572, 966, 1090, 1510 kDa (0,6 µg); S2: hochmolekulare HA (Contipro Biotech), Mw ≥ 2 MDa (10 µg).

Die Permeabilisierung der *E.coli* Zellen mit Polymyxin B erwies sich dabei am schonendsten für die HA-Synthasen. Anschließend wurde die HA Synthese mit Zell-Lysat von HAS exprimierenden *E. coli* Zellen, erzeugt durch Ultraschall, und den Enzymmodulen aus AP1 und AP2 ausgehend von Saccharose und GlcNAc durchgeführt (**Abb. 3.1.7**). Die Nukleotidzucker konnten mit dieser Methode erfolgreich durch die Enzymmodule ersetzt werden. Das Vorhandensein von HA in den Kontrollproben der pmHAS, sowie beim Zeitpunkt 0 sind durch eine Produktion von HA während der Expression zu erklären.

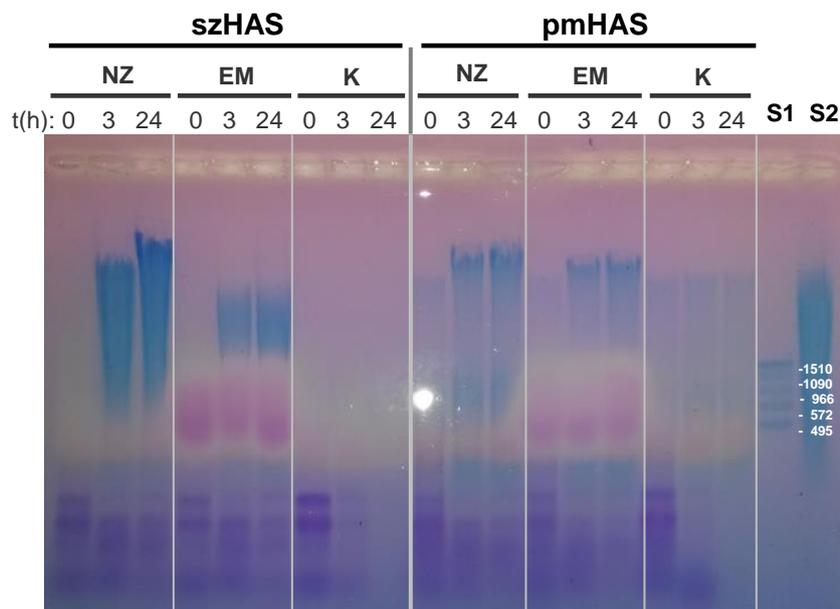


Abbildung 3.1.7: HA Synthese mit HAS-haltigem Zell-Lysat (Aufschluss mit Ultraschall), sowohl mit Nukleotidzuckern (NZ) als auch mit entsprechenden Enzymmodulen (EM) als Substrat. Der NZ-Reaktionsansatz startete mit 5 mM UDP-GlcA und 5 mM UDP-GlcNAc, der EM-Reaktionsansatz mit 200 mM Saccharose, 5 mM UDP, 10 mM NAD⁺, 5 mM GlcNAc, 5 mM ATP, 5 mM UTP. K (Kontrolle): das Zell-Lysat wurde nur mit Puffer inkubiert. Agarose-Gel mit *stains-all* Färbung. S1: Select-HA

HiLadder™ (Hyalose LLC), Mw = 495, 572, 966, 1090, 1510 kDa (0,6 µg); S2: hochmolekulare HA (Contipro Biotech), Mw ≥ 2 MDa (2,5 µg).

Abschließend wurde getestet, ob ein Aufschluss bzw. eine Permeabilisierung der Zellen überhaupt notwendig sind, um die HA Synthese zu gewährleisten. Interessanterweise konnte, wie **Abbildung 3.1.8** zeigt, eine HA Synthese mit einer Zellsuspension von HAS-exprimierenden *E. coli* Zellen, sowohl mit Nukleotidzuckern als auch mit den entsprechenden Enzymmodulen, realisiert werden.

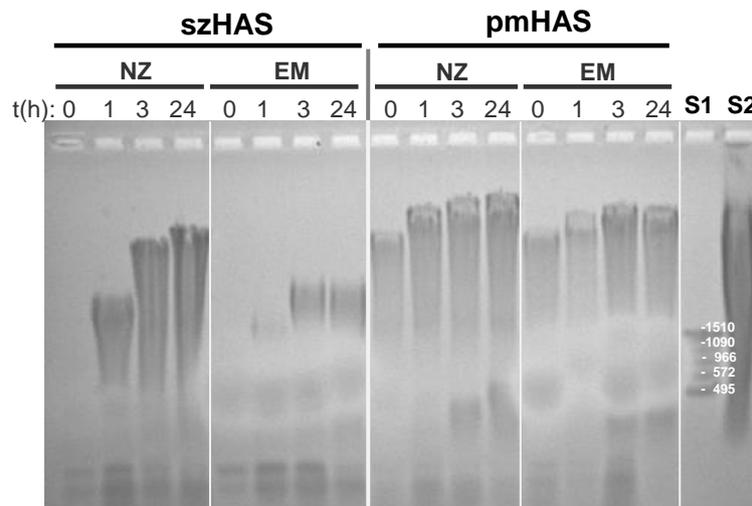


Abbildung 3.1.8: HA Synthese mit einer Suspension HAS-exprimierender *E. coli* Zellen. NZ: mit Nucleotidzuckern als Substrat (5 mM UDP-GlcA und 5 mM UDP-GlcNAc); EM: mit Enzymmodulen als Substrat (200 mM Saccharose, 5 mM UDP, 10 mM NAD⁺, 5 mM GlcNAc, 5 mM ATP und 5 mM UTP). Agarose-Gel mit *stains-all* Färbung. S1: Select-HA HiLadder™ (Hyalose LLC), Mw = 495, 572, 966, 1090, 1510 kDa (0,6 µg); S2: hochmolekulare HA (Contipro Biotech), Mw ≥ 2 MDa (10 µg).

Diskussion und Fazit: Es wurde ein generelles Verfahren entwickelt, um potentiell verbesserte Streptokokken-Synthasen aus dem Arbeitsprogramm 5.3 mit den Enzymmodulsystemen zu testen. Die Methode kann allgemein mit allen anderen membranassoziierten HA-Synthasen der Klasse I, die sich nicht löslich isolieren lassen, angewendet werden.

3.1.5 Arbeitspaket 5 (AP5)

Die Aufgabe im AP5 war die *in vitro* Kombination ausgesuchter HA-Synthasen aus AG Schwaneberg mit integrierter Synthese und Regeneration der Nucleotidzucker. Weiterhin sollten kleine synthetisierte HA Testmengen mit der von GALAB entwickelten Analytik (Arbeitsprogramm 5.4) analysiert werden.

Ergebnisse: Die Untersuchungen zum Einfluss des Nucleotidzuckerverhältnisses auf die Polymerisationsreaktion der pmHAS aus AP3 haben gezeigt, dass sich ein Überschuss an UDP-GlcNAc gegenüber UDP-GlcA günstig auf die Syntheserate auswirkt (**Abb. 3.1.4**). Die Integration eines Regenerationssystems für UDP-GlcA in das kombinierte Enzymmodulsystem aus **Abb. 3.1.5** erlaubt die variable Einstellung des Verhältnisses der Nucleotidzucker-Konzentrationen in der HA Synthese. Hierfür wurde das UDP-GlcA Modul ausgehend von Saccharose und UDP mit SuSy gestartet und die UDP-Konzentration zwischen 0,02 mM und 10 mM variiert. Das UDP-GlcNAc Modul wurde jeweils mit 10 mM GlcNAc gestartet und ohne PEP/PK-vermittelte UDP-GlcNAc Regeneration durchgeführt. Die

HA-Polymersynthese wurde mit Agarose-Gelelektrophorese und dem Trübungstest (CTAB-Methode (**Abb. 3.1.9** und **Abb. 3.1.10**) analysiert. Der Verlauf der Nucleotidprodukte und -produkte wurde mit MP-CE verfolgt (**Abb. 3.1.12**).

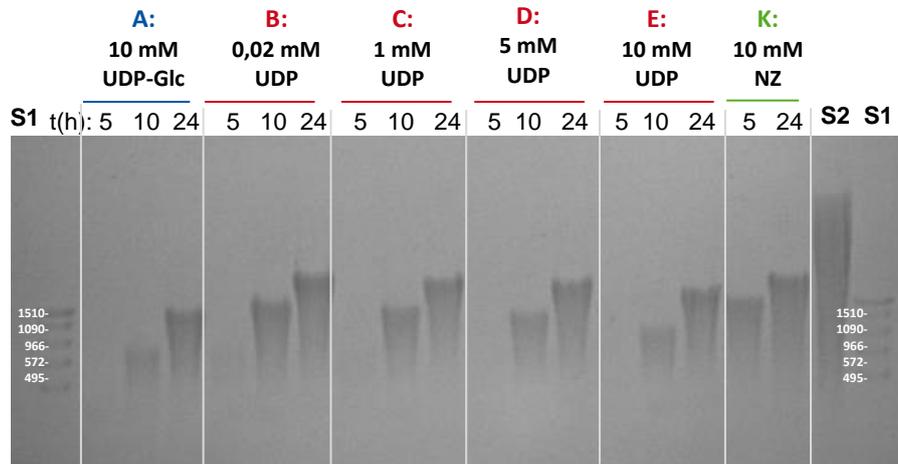


Abbildung 3.1.9: Eintopf-Synthese von HA durch Kombination aller Enzymmodule mit pmHAS ausgehend von Saccharose und GlcNAc mit integrierter UDP-GlcA Regeneration (Abb. 3.1.1). **A:** Start mit UDP-Glc ohne UDP Regeneration (ohne SuSy), Reaktionsansatz: 10 mM UDP-Glc, 20 mM NAD⁺, 10 mM GlcNAc, 10 mM ATP und 10 mM UTP. **B–E:** Start mit unterschiedlichen UDP-Konzentrationen und mit SuSy und Saccharose für die UDP-GlcA Regeneration, Reaktionsansatz: 200 mM Saccharose variierende UDP Konzentrationen, 20 mM NAD⁺, 10 mM GlcNAc, 10 mM ATP und 10 mM UTP. In allen Ansätzen wurde die UDP-GlcNAc Synthese ausgehend von 10 mM GlcNAc gestartet. **K:** pmHAS Reaktion mit Nucleotidzuckern, Reaktionsansatz: 10 mM UDP-GlcA und 10 mM UDP-GlcNAc. Agarose-Gel mit *stains-all* Färbung. S1: Select-HA HiLadder™ (Hyalose LLC), Mw = 495, 572, 966, 1090, 1510 kDa (0,6 µg); S2: hochmolekulare HA (Contipro Biotech), Mw ≥ 2 MDa (2,5 µg).

Die in **Abb. 3.1.9** dargestellten Ergebnisse zeigen, dass eine HA Polymersynthese mit UDP-GlcA Regeneration möglich ist. Dabei zeigen die Synthesen in Abhängigkeit von der eingesetzten UDP Startkonzentration Unterschiede im Mw der HA. Bei kleiner UDP Konzentration (0,02 mM) im Ansatz wird nach 10 h mehr HA Polymer und nach 24 h HA mit höherem MW gebildet. Weiterhin bestätigt die Messung der HA Produktbildung (**Abb. 3.1.10**) und der Verlauf der Nucleotidzucker-Konzentrationen (**Abb. 3.1.11**) die in AP3 gewonnenen Erkenntnisse, dass sich eine niedrige UDP-GlcA Konzentration vorteilhaft auf die Synthesegeschwindigkeit auswirkt. In **Abb. 3.1.10** wird deutlich, dass die HA Produktbildungsrate bei kleineren UDP Konzentrationen (Ansätze B, C und D) deutlich ansteigt im Vergleich zu den Ansätzen bei hoher UDP (Ansatz E) oder hoher UDP-Glc Konzentration (Ansatz A). Allerdings sind die Reaktionen mit den Enzymmodulen (Ansätze A-E) grundsätzlich langsamer als die Kontrollreaktion mit Nucleotidzuckern als Substrat (Ansatz K), da bei A-E die Nucleotidzucker erst *in situ* gebildet werden müssen.

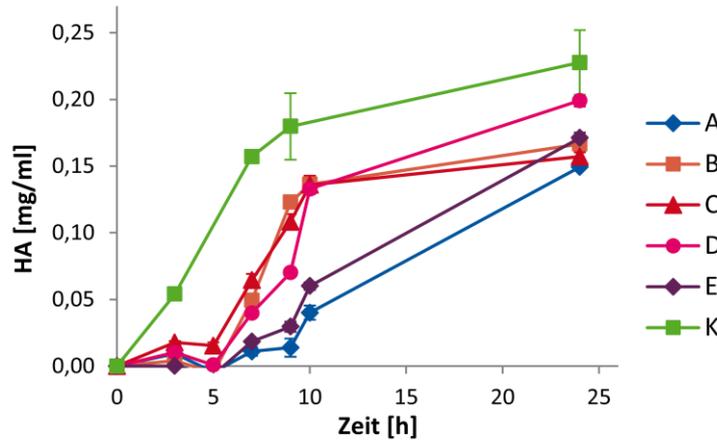


Abbildung 3.1.10: HA Produktbildung der Ansätze aus Abb. 3.1.9, gemessen mittels CTAB Trübungsmethode. Bei einem vollständigen Umsatz wird eine HA Konzentration von 4 mg/mL im Syntheseansatz erwartet; für den Assay wurden die Proben 1:20 verdünnt, so dass 0,2 mg/mL auf der y-Achse dem möglichen Maximum entsprechen.

Mit der MP-CE Analytik lässt sich der Konzentrationsverlauf aller Nukleotide und Nukleotidzucker während der HA Produktbildung verfolgen und deren Verhältnisse zu jedem Zeitpunkt bestimmen. **Abbildung 3.1.11** zeigt die zugehörigen Verläufe für die Ansätze B und E aus **Abb. 3.1.9** mit UDP-GlcA Regeneration. In Ansatz B (0,02 mM UDP) wird deutlich, dass UDP-GlcNac zum Anfang der Reaktion in einem großen Überschuss zu UDP-GlcA vorliegt. Während der HA-Polymersynthese kehrt sich das Verhältnis um, da GlcNac vollständig verbraucht und UDP-GlcA aus UDP weiterhin synthetisiert wird. In Ansatz E (10 mM UDP) steigen die Konzentrationen von UDP-GlcA und UDP-GlcNac zunächst in einem ähnlichen Verhältnis an, verlaufen aber nach etwa 4 h auch gegenläufig, jedoch in diesem Fall mit einem Unterschuss an UDP-GlcNac. Diese Unterschiede im Konzentrationsverhältnis der Nukleotidzucker haben unterschiedliche Produktbildungsraten zur Folge (**Abb. 3.1.10**). Ein Überschuss an UDP-GlcNac (Ansatz B) ist vorteilhaft für die Produktbildungsrate; während ein Überschuss an UDP-GlcA (Ansatz E) eine niedrige Produktbildungsrate zur Folge hat. Diese Ergebnisse spiegeln damit die gewonnenen Daten aus AP3 (**Abb. 3.1.4**) wieder.

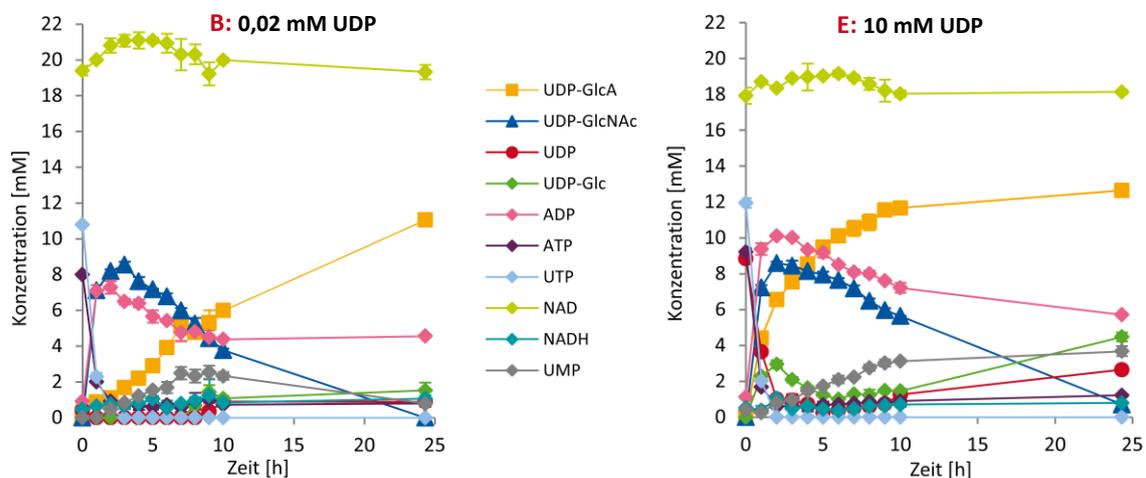


Abbildung 3.1.11: Verläufe der Nukleotid- und Nukleotidzuckerkonzentrationen in den Syntheseansätzen B und E aus Abbildung 3.1.9, gemessen mit MP-CE. **Ansatz B (links):** mit UDP-

Regeneration, 0,02 mM UDP. **Ansatz E (rechts):** mit UDP-Regeneration, 10 mM UDP. In beiden Regenerationsansätzen bleibt die Menge an UDP auf einem konstant niedrigen Niveau, während UDP-GlcA in dem Maße ansteigt, wie das im HAS-Modul freigesetzte UDP wieder für die Regeneration von UDP-GlcA genutzt wird.

Um die UDP-GlcA Regeneration auch mit der in AP4 vorgestellten Methode zur Analyse von Streptokokken-Synthasen zu etablieren, wurde der in **Abb. 3.1.9** beschriebene Ansatz mit permeabilisierten *E. coli* Zellen, welche die HA-Synthase (szHAS bzw. pmHAS) exprimieren, anstatt mit isolierter pmHAS durchgeführt (**Abb.3.1.12**). Das UDP-GlcNAc Modul wurde dabei jeweils mit 5 mM GlcNAc gestartet und das UDP-GlcA Modul wurde entweder ohne Regeneration mit 5 mM UDP-Glc (A), oder mit Regeneration mit 5 mM UDP (B) bzw. 0,02 mM UDP (C) und jeweils Saccharose gestartet.

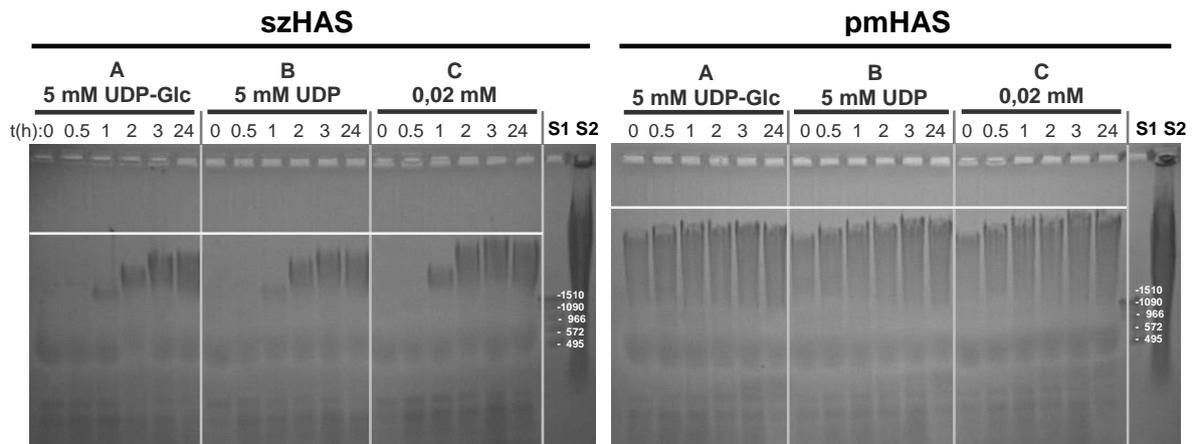


Abbildung 3.1.12: Eintopfsynthese von HA unter Kombination aller Enzymmodule mit permeabilisierten *E. coli* Zellen ausgehend von Saccharose und GlcNAc mit integrierter UDP-GlcA Regeneration. Die permeabilisierten Zellen wurden durch Behandlung mit Polymyxin B erzeugt. **A:** ausgehend von UDP-Glc, Reaktionsansatz: 5 mM UDP-Glc, 10 mM NAD⁺, 5 mM GlcNAc, 5 mM ATP und 5 mM UTP. **B:** mit UDP-GlcA Regeneration, 5 mM UDP; Reaktionsansatz: 200 mM Saccharose, 5 mM UDP, 10 mM NAD⁺, 5 mM GlcNAc, 5 mM ATP und 5 mM UTP. **C:** mit UDP-GlcA Regeneration, 0,02 mM UDP; Reaktionsansatz: 200 mM Saccharose, 0,02 mM UDP, 10 mM NAD⁺, 5 mM GlcNAc, 5 mM ATP und 5 mM UTP. Agarose-Gele mit *stains-all* Färbung. S1: Select-HA HiLadder™ (Hyalose LLC), Mw = 495, 572, 966, 1090, 1510 kDa (0,6 µg); S2: hochmolekulare HA (Contipro Biotech), Mw ≥ 2 MDa (10 µg).

In **Abbildung 3.1.12** ist insbesondere für die szHAS sehr deutlich zu sehen, dass sich die Reaktionsansätze A, B und C unterscheiden. Während die Reaktionsverläufe, die entweder mit 5 mM UDP-Glc oder mit 5 mM UDP starten (Ansätze A und B), ähnlich sind, erfolgt die Produktbildung im Reaktionsansatz mit niedriger UDP Konzentration (Ansatz C) schneller. Gleichzeitig wird bei geringer UDP Konzentration bereits nach 3 h ein höheres Mw erreicht. Durch die niedrige initiale UDP Konzentration wird auch die initiale Menge an UDP-GlcA gering gehalten. Somit wird ein Überschuss an UDP-GlcNAc eingestellt, der sich in AP3 als maßgebender Faktor für die Erhöhung der Produktbildungsrate erwiesen hat (**Abb. 3.1.4**). Diese mit permeabilisierten Zellen gewonnenen Daten spiegeln auch die Ergebnisse wieder, die unter selbem Versuchsaufbau (mit 10 mM Substraten) mit isolierter pmHAS gewonnen wurden (**Abb. 3.1.9**). Desweiteren wird hier zum ersten Mal gezeigt, dass ein Überschuss an UDP-GlcNAc gegenüber UDP-GlcA die Produktbildungsrate und das Mw auch für die szHAS positiv beeinflusst.

Meilenstein 2 (MS 2): *In vitro* Synthese kleiner Testmengen von Hyaluronan mit *in situ* Regeneration von UDP-GlcA und UDP-GlcNAc

Der Meilenstein 2 wurde erreicht. Die *in vitro* HA Eintopfsynthese ausgehend von Saccharose und GlcNAc mit kombinierten Enzymmodulen und pmHAS wurde erfolgreich etabliert. Eine kleine Testmenge an HA wurde zur Analytik an den Projektpartner GALAB weiter gereicht (siehe MS1).

Diskussion und Fazit: Die Regeneration von UDP-GlcA durch SuSy wurde erfolgreich in das Enzymmodulsystem integriert und eine *in vitro* HA Eintopfsynthese konnte ausgehend von Saccharose und GlcNAc mit kombinierten Enzymmodulen (entsprechend **Abb. 3.1.1**, AP5, ohne PEP/PK) erfolgreich durchgeführt werden. Die UDP-Rezyklierung erlaubt es nicht nur, den teuren Nucleotidzucker zu regenerieren, sondern initial auch bestimmte Nucleotidzuckerverhältnisse einzustellen. Das Verhältnis der Nucleotidzucker hat sich in AP3 und AP5 als maßgeblicher Einflussfaktor erwiesen, der die Produktbildungsrate, sowie das Mw kontrolliert. Ein Überschuss an UDP-GlcNAc gegenüber UDP-GlcA erhöht dabei stark die Syntheserate und das erhaltene Mw. Durch die kombinierte Analytik aus MP-CE, Agarose-Gelen und CTAB-Trübungsmethode konnten die Verhältnisse der Nucleotidzucker direkt mit der gebildeten HA Menge und der Molmasse korreliert werden. Desweiteren konnte das Enzymmodulsystem von der Anwendung mit einer isolierten HA-Synthase (pmHAS) auf die Anwendung mit einem Ganzzellansatz aus permeabilisierten oder aufgeschlossenen *E. coli* Zellen erweitert werden. Auf diese Weise konnte der Einfluss des Nucleotidzuckerverhältnisses auch mit der Klasse I HA-Synthase szHAS untersucht werden. Die Versuche ergaben, dass ein UDP-GlcNAc Überschuss, ebenso wie bei der pmHAS, die Produktbildung beschleunigt und das Mw erhöht. Die vorgestellte Methode bietet grundsätzlich die Möglichkeit, alle membranassoziierten HA-Synthasen, die sich nicht löslich exprimieren lassen, in Kombination mit dem Enzymmodulsystem zu untersuchen.

3.2 Arbeitsprogramm 5.2 (AG Schwaneberg): Protein Engineering einer ausgewählten HA-Synthase

Ziel des **Arbeitsprogrammes 5.2** war es eine maßgeschneiderte HA-Synthase mittels Protein Engineering zu generieren, die langkettige HA-Polysaccharide (≥ 2 MDa) produziert (**Abb. 3.2.1**).

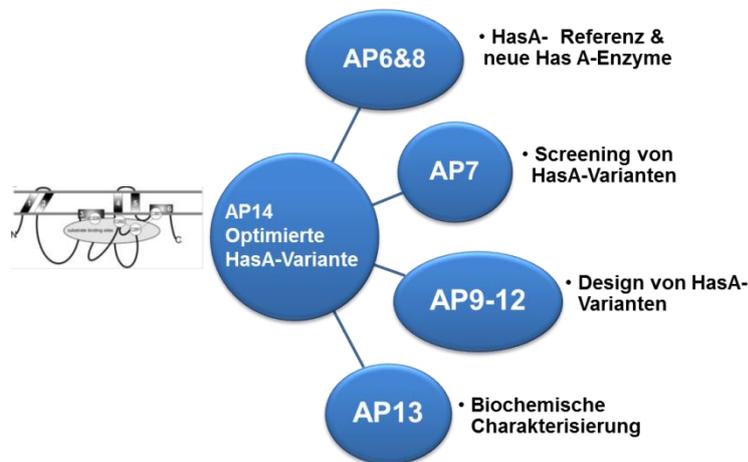


Abbildung 3.2.1: Übersicht der Arbeitspakete (AP) zum **Arbeitsprogramm 5.2**.

Für das Protein Engineering wurde ein semi-rationaler Ansatz (gleichzeitige Sättigungsmutagenese mehrerer Positionen in der Bindungstasche) und ein Gelenkter Evolutionsansatz verfolgt (Zufallsmutagenese, um Positionen aufzufinden, die die Aktivität und Kettenlängenspezifität beeinflussen).

3.2.1 Arbeitspaket 6 (AP6)

Die Aufgabe im AP6 war die Untersuchung von zwei Expressionssystemen (*Bacillus*-Stämme WB600 & *B. subtilis* DB104; *S. cerevisiae*) für die HA-Synthase HasA aus *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, szHAS (Referenzsystem), auf Eignung für Gelenkte Evolution.

Ergebnisse: Das synthetische Gen der HA-Synthase *hasA* aus *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (szHAS) wurde optimiert und anschließend in drei Expressionsvektoren für die Produktion in *Bacillus*, Hefe und *E. coli* kloniert. Die Produktion der HA-Synthase wurde für die Expressionssysteme *B. subtilis* DB104, *S. cerevisiae* und zusätzlich für *E. coli* BL21 Gold DE3 untersucht und optimiert. Die Produktion der Hyaluronsäure (HA) erfolgt *in vitro* nach Zellaufschluss (HA-Synthase in der Zellmembran) und unter Zugabe der Substrate UDP-GlcA und UDP-GlcNAc. Es wurde ein Nachweisverfahren zur Bestimmung des Molekulargewichts der HA (basierend auf Agarose-Gelelektrophorese) und ein Detektionssystem zur Bestimmung der Hyaluronsäurekonzentration (basierend auf dem CTAB-Reagenz (Cetyltrimethylammoniumbromid)) etabliert. Eine erfolgreiche Produktion und Detektion der Hyaluronsäure wurde für die Expressionssysteme in *E. coli* und *S. cerevisiae* nachgewiesen. **Abbildung 3.2.2** zeigt die Hyaluronsäure-Synthese (HasA; blaue Banden) in dem verwendeten *E. coli* Produktionssystem.

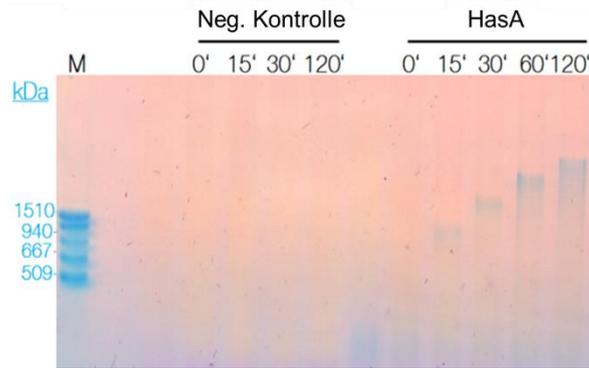


Abbildung 3.2.2: Hyaluronsäure-Synthese (blaue Banden) mittels in *E. coli* produzierter Hyaluronsäure-Synthase (szHAS) zu verschiedenen Synthesezeitpunkten (in Minuten). **M:** HA Standard.

Diskussion: Es wurden zwei Produktionssysteme zur Herstellung einer funktionalen Hyaluronsäure-Synthase etabliert und somit das AP6 erfüllt.

Fazit: Für ein erfolgreiches Protein Engineering (AP9 und AP10), ist eine hohe Transformationseffizienz und ein homogenes Expressionsniveau vorteilhaft, aus diesem Grund wurden die weiteren Arbeiten in *E. coli* durchgeführt. Ein weiterer entscheidender Vorteil des *E. coli* Expressionssystems ist die geringere Generationszeit im Vergleich zu *S. cerevisiae*.

3.2.2 Arbeitspaket 7 (AP7)

Die Aufgabe in AP7 war die Entwicklung eines Durchmusterungsprotokolls für Mutantenbibliotheken (AP10 & AP11) im 96-Mikrotiterplattenformat. Der Produktnachweis sollte über die Ladungseigenschaften von HA-Polymeren, Transesterifikation mit einer Esterase/Lipase oder Reduktion mit einer HA-Dehydrogenase erfolgen.

Ergebnisse: Die Entwicklung eines robusten und verlässlichen Durchmusterungsprotokolls ist Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Durchmusterung von Variantenbibliotheken. Die Produktion der Hyaluronsäure Synthase HasA (szHAS) und die *in vitro* Produktion der Hyaluronsäure wurden auf das Mikrotiterplattenformat skaliert und optimiert. Während der Optimierungsphase stellte sich heraus, dass die Permeabilisierung der Zellen im Mikrotiterplattenformat für eine hohe Enzymaktivität ausschlaggebend war. Hier war ein auf Polymyxin B basierender Zellaufschluss zielführend.

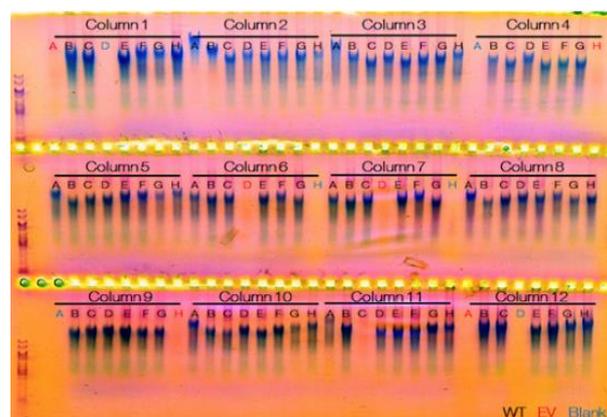


Abbildung 3.2.3: Nachweis der Hyaluronsäure-Synthese im 96er Mikrotiterplattenformat.

Der HA-Nachweis erfolgte zunächst mittels Agarose-Gelelektrophorese (**Abb. 3.2.3**). Neben dem arbeits- und zeitintensiven Nachweis mittels Gelelektrophorese wurde auch die

Entwicklung eines Größenausschlussverfahrens über die Ladungseigenschaften der HA-Polymere mittels 96-Kanal Anionenaustauscher durchgeführt. Hier werden die langkettigen HA-Polymere unter definierten Bedingungen (pH, Salzkonzentration) gebunden und anschließend wird die Hyaluronsäure nach Polymerlänge (Ladungsstärke) aufgetrennt. Nach erfolgtem Größenausschluss wurde die in AP6 bereits etablierte CTAB-Trübungsmethode verwendet. Das Anionenaustauscher-Verfahren wurde durch die Verwendung kommerzieller Hyaluronsäure etabliert. Im Projektverlauf hat sich herauskristallisiert, dass die mittels *E. coli* Expressionssystem erreichten HA-Konzentrationen nicht ausreichend waren, um diese nach dem Anionenaustauscher-Verfahren mittels CTAB-Trübungsmethode nachzuweisen. Auch die Anpassung mehrerer Parameter (u.a. Enzym-, Substratkonzentration sowie Reaktionszeiten) war nicht zielführend. Alternativ zur CTAB-Trübungsmethode wurden mit dem AlcianBlue Nachweisverfahren und der Fluoreszenzmarkierung mittels reduktiver Aminierung [8, 9] zwei weitere sensitivere HA-Nachweisverfahren etabliert. Auch diese konnten nicht in Kombination mit dem Anionenaustauscher-Verfahren verwendet werden. Aus diesen Gründen wurde für die Durchmusterung der Variantenbibliotheken auf das arbeits- und zeitintensive Gelelektrophorese-Verfahren zurückgegriffen, welches zum einen nur einen limitierten Durchsatz ermöglicht und zum anderen in der Größentrennung stärkeren Schwankungen unterliegt und somit als nicht optimal angesehen wird.

Zur Validierung des Durchmusterungssystems wurden die literaturbeschriebenen [10] Aminosäurepositionen K48 und E327 einer Sättigungsmutagenese unterzogen (360 Varianten generiert (AP9)) und durchgemustert. Kumari et al. beschreiben, dass die Aminosäuresubstitution K48E zu kurzkettigen HA-Polymeren im Vergleich zum Wildtyp führt. Diese beschriebene Aminosäuresubstitution K48E wurde identifiziert und somit das Durchmusterungssystem anhand von kurzkettigen HA-Polymeren validiert.

Diskussion: Die Hauptherausforderung des AP7 ist es, die membranständige Hyaluronsäuresynthase szHAS im Mikrotiterplattenformat in ausreichenden Mengen zu produzieren und durch einen effizienten Zellaufschluss die Synthese von ausreichenden Mengen an Hyaluronsäure zu garantieren. Trotz vielfältiger Ansätze (Test von vier unterschiedlichen HA-Nachweisverfahren) ist es nicht gelungen einen verlässlichen HA-Nachweis im Mikrotiterplattenformat zu etablieren, der eine Trennung von HA-Polymeren unterschiedlicher Länge ermöglicht. Aus diesem Grund wurde für die Durchmusterung auf das arbeits- und zeitintensive Gelelektrophorese-Verfahren zurückgegriffen und die Limitierungen des Verfahrens in Kauf genommen (geringer Durchsatz, Schwankungen in der Größenaufftrennung über das Gel). Anhand einer Mutantenbibliothek wurde das Gelelektrophorese-Durchmusterungssystem für kurzkettige HA-Polymere validiert. Aus Mangel an langkettigen HA-Standards konnte das System nicht für langkettigere HA-Polymere (im Vergleich zum Wildtyp) validiert werden, was einen Risikofaktor für die Durchführung der Gelenkten Evolution darstellt.

Fazit: Mit dem Gelelektrophorese-Verfahren wurde ein Durchmusterungssystem etabliert, welches für die Durchmusterung der Mutantenbibliotheken eingesetzt werden kann, aber nicht als optimal erachtet wird (geringer Durchsatz, Schwankungen in der Größenaufftrennung über das Gel).

3.2.3 Arbeitspaket 8 (AP8)

Die Aufgabe im AP8 war der Vergleich mit zwei „neuen“ HA-Synthasen aus AG Blank und Entscheidung für eine zu evolvierende HA-Synthase.

Ergebnisse: Wie in AP15 (Arbeitsprogramm 5.3) ausgeführt, wurden drei neue HA-Synthasen identifiziert, die in kleinen Fermentationsansätzen bereits HA mit $>>2$ MDa

produzieren. Aus diesem Grund wurden diese HA-Synthasen nicht weiter mit Gelenker Evolution bearbeitet.

Diskussion: In Absprache mit den beteiligten Partnern wurde die HA-Synthase szHAS für die Gelenker Evolution in *E. coli* weiter bearbeitet.

Meilenstein 3 (MS3): Mittels einer Mutantenbibliothek validiertes Hochdurchsatz-durchmusterungssystem im 96-Mikrotiterplattenformat

Der Meilenstein 3 wurde erreicht: Durch die Durchmusterung einer an der Aminosäureposition 48 angelegten Sättigungsmutagenese-Bibliothek wurde die literaturbeschriebene Aminosäuresubstitution K48E aufgefunden, welche verantwortlich für die Synthese kurzkettiger HA-Polymere im Vergleich zu Wildtyp ist. Anhand einer Mutantenbibliothek wurde das Gelelektrophorese-Durchmusterungssystem validiert.

Fazit: Die HA-Synthase szHAS zeigt bereits eine *in vitro* HA-Synthese mit einer Polymergröße von bis zu 2.0 MDa und wurde somit als geeigneter Ausgangspunkt für das vorgesehene *Protein Engineering* ausgewählt (AP9 und AP10).

3.2.4 Arbeitspaket 9 (AP9)

Die Aufgabe im AP9 war, zwei OmniChange Bibliotheken mit gleichzeitiger Sättigungsmutagenese an jeweils bis zu vier rational identifizierten Positionen in der Bindungstasche und dem „Cysteincluster“ zu generieren (je Variantenbibliothek mind. 2000 Varianten durchgemustert).

Ergebnisse: Der Austausch einzelner Aminosäuren an den in der Literatur beschriebenen Positionen Cys262, Cys226, Cys281 & Cys367 zeigt einen Effekt auf die szHAS Aktivität und die Kettenlängen der produzierten Hyaluronsäure [11]. Ein mittels YASARA generiertes Homologie-Modell der HA-Synthase zeigt, dass die Aminosäuren Cys262, Cys226 und Cys281 in direktem Kontakt mit der gebildeten Hyaluronsäure stehen (**Abb.3.2.4**). Aus diesem Grund wird der Effekt der Aminosäuresubstitutionen an den zuvor beschriebenen Positionen zunächst einzeln, mittels Sättigungsmutagenese untersucht, um im Anschluss mögliche kombinatorische Effekte mittels OmniChange zu identifizieren.

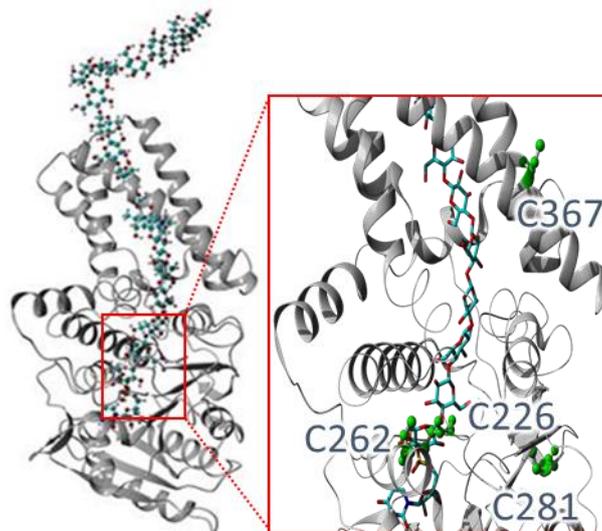


Abbildung 3.2.4: Homologiemodell der szHAS und der identifizierte „Cysteincluster“ (roter Kasten).

Die Sättigungsmutagenese an Position Cys262, Cys226 und Cys281 wurden durchgeführt und pro Aminosäureposition eine 200 Varianten umfassende Varianten-Bibliothek angelegt (insgesamt 600 Varianten). Diese Bibliotheken wurden mit dem in AP7 entwickelten

Gelelektrophorese-Verfahren durchgemustert. Es wurden keine Varianten identifiziert, die längere HA-Polymere als der Wildtyp gebildet haben. Die geplanten OmniChange Bibliotheken konnten somit nicht generiert bzw. durchgemustert werden. **Abbildung 3.2.5** zeigt eine Auswahl der Agarosegele, die in der Durchmusterung des Cysteinclusters generiert wurden.

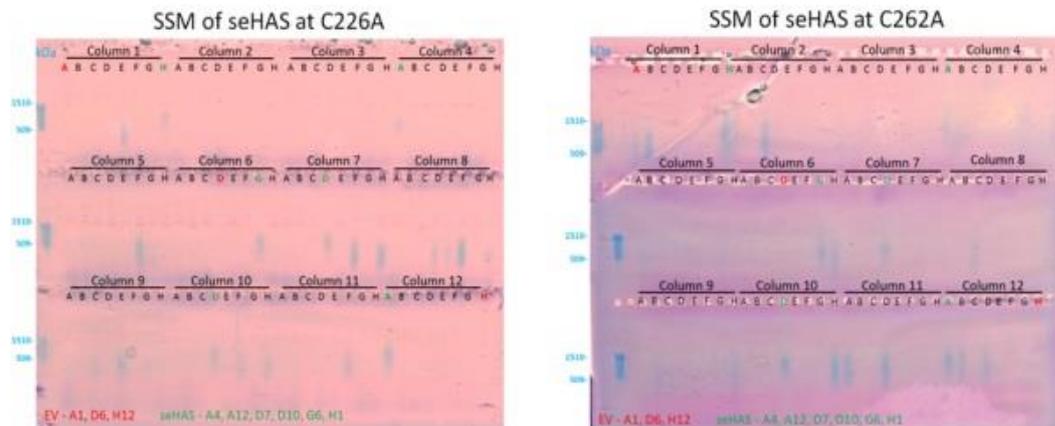


Abbildung 3.2.5: In den Sättigungsmutagenese-Bibliotheken des „Cysteinclusters“ wurden keine Varianten identifiziert, die längere HA-Ketten im Vergleich zum Wildtyp produzieren.

Zusätzlich zu dem identifizierten Cysteincluster wurden die literaturbeschriebenen [10] Positionen K48 und E327 einer Sättigungsmutagenese unterzogen (360 Varianten generiert und durchgemustert). Auch hier wurde keine Aminosäuresubstitution identifiziert, die zu längeren HA-Polymeren im Vergleich zum Wildtyp führt. Die von Kumari et al. beschriebene Aminosäuresubstitution K48E, die zu kurzkettingen HA-Polymeren führt, wurde ebenfalls identifiziert, wodurch das Durchmusterungssystem validiert werden konnte.

Diskussion: In der Durchmusterung der Variantenbibliothek des „Cysteinclusters“ konnten keine verbesserten Varianten identifiziert werden. Auch die zusätzliche Durchmusterung von zwei literaturbeschriebenen Aminosäurepositionen, die einen Einfluss auf die Kettenlänge des HA-Polymers haben, war erfolglos. Aus diesem Grund konnten die geplanten OmniChange Bibliotheken nicht generiert bzw. durchgemustert werden.

Fazit: Die Sättigungsmutagenese des Cysteinclusters und zwei weiteren Positionen führte nicht zur Identifikation von HasA (szHAS) Varianten, die längere HA-Polymere im Vergleich zum Wildtyp synthetisieren.

3.2.5 Arbeitspaket 10 (AP10)

Die Aufgabe im AP10 war das Einstellen von Mutagenesebedingungen (epPCR mit $MnCl_2$) für die Zufallsmutagenese und die Optimierung der Klonierung.

Ergebnisse: Die Mutagenesebedingungen für die in der Gelenkten Evolution eingesetzte epPCR wurden optimiert (0,1 mM $MnCl_2$, **Abb. 3.2.6**). Die Erhöhung der $MnCl_2$ Konzentration in der fehlerhaften PCR (epPCR) führte zu einer steigenden Anzahl an Mutationen im *hasA* Gen und damit zu einer Reduktion der aktiven Varianten in der Varianten-Bibliothek. Erfahrungswerte zeigen, dass in Bibliotheken mit ~50 % aktiven Varianten mit hoher Wahrscheinlichkeit verbesserte Enzymvarianten aufgefunden werden. Die Klonierung der mutagenisierten Gene in den Expressionsvektor pET22b(+) erfolgte mittels MEGAWHOP [12]. Eine 2000 Varianten umfassende Bibliothek wurde angelegt, die Sequenzierung von zufällig ausgewählten Varianten (Qualitätskontrolle) ergab, dass pro Variante 3 Mutationen in das Gen eingefügt wurden.

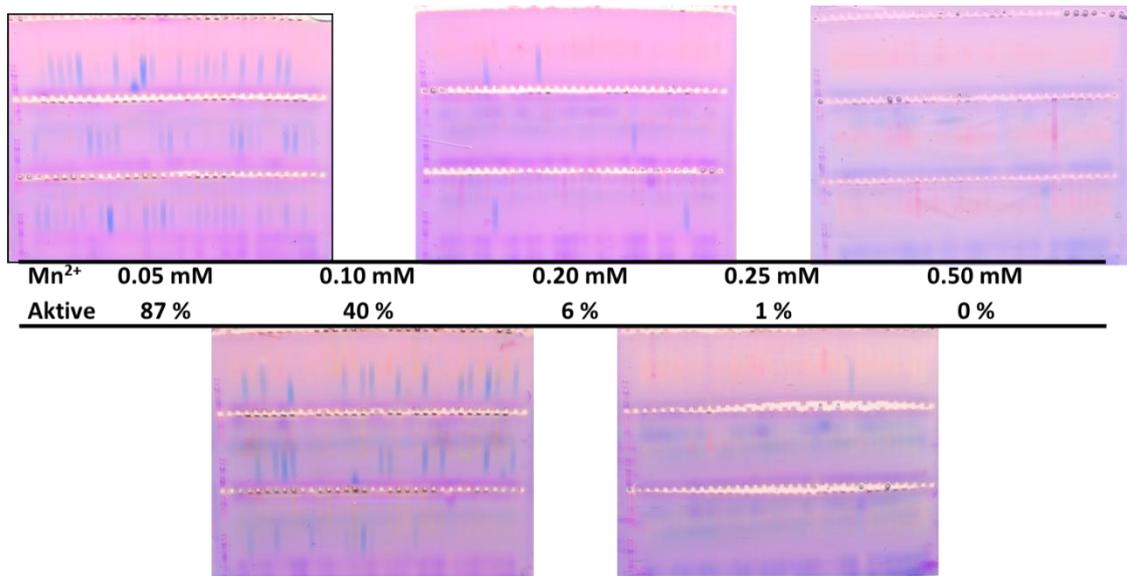


Abbildung 3.2.6: Einstellen der fehlerhaften PCR (epPCR) Bedingungen. Die Erhöhung der MnCl₂ Konzentration in der fehlerhaften PCR (epPCR) führte zu einer steigenden Anzahl an Mutationen im *hasA* Gen und damit zu einer Reduktion der aktiven Varianten in der Varianten-Bibliothek. Erfahrungswerte zeigen, dass in Bibliotheken mit ~50 % aktiven Varianten mit hoher Wahrscheinlichkeit verbesserte Enzymvarianten aufgefunden werden.

Diskussion: Die Mutagenesebedingungen (epPCR mit MnCl₂) wurden eingestellt und die Klonierung mittels MEGAWHOP etabliert. Eine 2000 Varianten umfassende Varianten-Bibliothek wurde angelegt.

Fazit: Eine Variantenbibliothek wurde angelegt, die Qualität über den Anteil an aktiven Enzym-Varianten und Sequenzierung (~3 Mutationen pro Gen) eingestuft.

3.2.6 Arbeitspaket 11 (AP11)

Die Aufgabe im AP11 war die Gelenkte Evolution mit einer epPCR Mutantenbibliothek und zwei SeSaM-Mutantenbibliotheken zur Erhöhung der Aktivität und HA-Kettenlänge durchzuführen (mind. 2000 Varianten pro Mutantenbibliothek durchgemustert).

Ergebnisse: Die 2000 Varianten umfassende Varianten-Bibliothek wurde in AP10 angelegt und mit dem in AP7 beschriebenen Gelelektrophorese-Durchmusterungssystem analysiert. Die Durchmusterung der 2000 Varianten resultierte in 12 Varianten, die potentiell längere HA-Polymere produzieren. Die vorläufige Charakterisierung dieser potentiellen Varianten (Produktion im größeren Schüttelkolbenmaßstab) ergab, dass keine der in der Gelenkten Evolution identifizierten Varianten HA-Polymere mit längeren Ketten im Vergleich zum Wildtyp synthetisieren (**Abb. 3.2.7**).

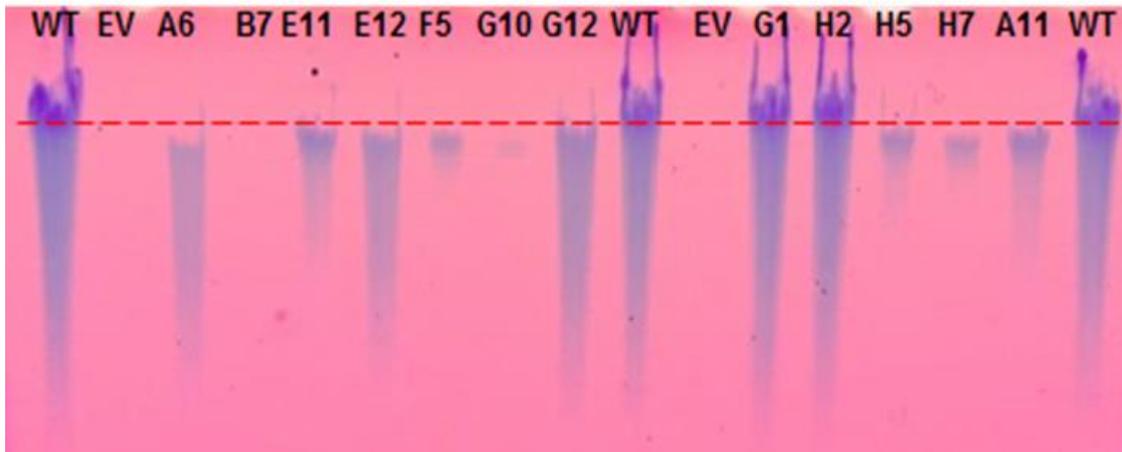


Abbildung 3.2..7: Vorläufige Charakterisierung der potentiellen Varianten (A6, B7, E11, E12, F5, G10, G12, G1, H2, H5, H7 und A11). Die synthetisierten HA-Polymere der Varianten zeigen entweder die gleiche (Varianten G1 und H2) oder eine reduzierte Syntheseleistung im Vergleich zum Wildtyp (WT).

Diskussion: Die Qualität der generierten Varianten-Bibliothek wurde über Sequenzierungen und den Anteil der aktiven Varianten in AP10 validiert. In AP7 wurden insgesamt 4 unterschiedliche HA-Nachweisverfahren entwickelt. Mit dem Gelelektrophorese-Verfahren wurde ein Durchmusterungssystem eingesetzt, welches für die Identifizierung kurzkettiger HA-Polymere validiert werden konnte, jedoch nicht für langkettigere HA-Polymere im Vergleich zum Wildtyp. Aus diesem Grund wird angenommen, dass das verwendete Durchmusterungssystem der limitierende Faktor in den Gelenkten Evolutionsexperimenten war und es im Rahmen der Projektlaufzeit nicht gelungen ist ein für das verwendete *E. coli* Expressionssystem kompatibles Durchmusterungssystem zu etablieren.

Meilenstein 4 (MS 4): In Aktivität (min. Faktor 6) und Kettenlängenspezifität (HA-Polymer-Kettenlänge \geq 2 MDa) „verbesserte“ HA-Synthasen

Der Meilenstein 4 wurde nicht erreicht: Mit der szHAS wurde eine HA-Synthase ausgewählt, die *in vitro* bereits HA-Polymer bis zu 2 MDa synthetisiert. Durch die Gelenkte Evolution sollte die HA-Polymer-Kettenlänge weiter erhöht werden, was jedoch nicht umgesetzt werden konnte. Als Hauptursache wird das Durchmusterungssystem angesehen, welches den Anforderungen der Gelenkten Evolution nicht genügt.

Fazit: In der Durchmusterung der validierten 2000 Varianten umfassenden Bibliothek konnte keine szHAS Variante identifiziert werden, die im Vergleich zum Wildtyp langkettige HA-Polymere synthetisiert. Als Schwachpunkt in den Gelenkten Evolutionsexperimenten wird das Durchmusterungssystem angesehen, aus diesem Grund wurden insgesamt vier Verfahren zum Nachweis von Hyaluronsäure entwickelt, welche alle nicht den Anforderungen der Gelenkten Evolution standhalten konnten.

3.2.7 Arbeitspaket 12 (AP12)

Die Aufgabe im AP12 war die Einführung der in AP11 neu aufgefunden Positionen (bis zu zehn) mittels Sättigungsmutagenese in Wildtyp HA-Synthase und Durchmusterung der Variantenbibliotheken. Über Gensynthese werden die „positiven“ Austausche in die „beste“ Variante aus AP9 eingefügt.

Ergebnisse/Diskussion/Fazit: Das Arbeitspaket konnte nicht bearbeitet werden, da keine verbesserten Varianten generiert bzw. identifiziert wurden. In Absprache mit den Partnern

wurde beschlossen die Arbeitskraft auf die Entwicklung eines geeigneten HA-Nachweisverfahrens zu fokussieren.

3.2.8 Arbeitspaket 13 (AP13)

Die Aufgabe in AP13 war die Reinigung, kinetische und kettenlängenspezifische Charakterisierung von Wildtyp HA und von bis zu fünf verbesserten Varianten aus AP9, AP11 und AP12.

Ergebnisse/Diskussion/Fazit: Das Arbeitspaket konnte nicht bearbeitet werden, da keine verbesserten Varianten generiert bzw. identifiziert wurden. In Absprache mit den Partnern wurde beschlossen die Arbeitskraft auf die Entwicklung eines geeigneten HA-Nachweisverfahrens zu fokussieren.

3.2.9 Arbeitspaket 14 (AP14)

Die Aufgabe in AP14 war die Weitergabe der HA-Synthasevarianten-Gene an die Projektpartner.

Ergebnisse/Diskussion/Fazit: Das Arbeitspaket konnte nicht bearbeitet werden, da keine verbesserten Varianten generiert bzw. identifiziert wurden.

3.3 Arbeitsprogramm 5.3 (AG Blank): Metabolic Engineering einer Hyaluronsäure produzierenden Bäckerhefe

Ziel des **Arbeitsprogrammes 5.3** war es basierend auf einer Bäckerhefe einen Hochleistungsstamm für die Produktion von hochmolekularer Hyaluronsäure zu erstellen (**Abbildung 3.3.1**). Dafür sollte ein neuartiger Syntheseweg, der im Arbeitsprogramm 5.1 erarbeitet wurde, als Blaupause für den rekombinanten Stoffwechselweg in Bäckerhefe verwendet werden.

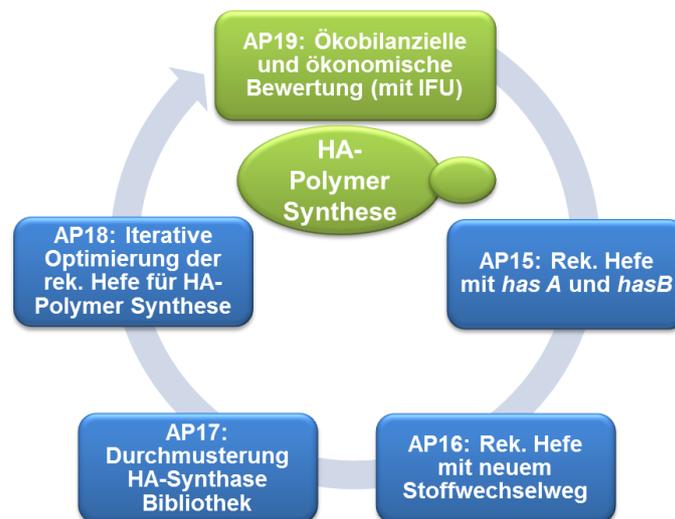


Abbildung 3.3.1: Übersicht der Arbeitspakete (AP) zu den **Arbeitsprogrammen 5.3 und 5.5**.

Es sollte insbesondere die Gesamtaktivität (Fluss) und die Konzentration der beiden aktivierten Monomere, die die Substrate für die HA-Synthase bilden, betrachtet werden. Im Vergleich zu den natürlichen Wirtsorganismen (pathogene Streptokokken) und den literaturbekannten rekombinanten Systemen (*B. subtilis*, *E. coli*, *L. lactis*) könnte die Hefe-Fermentation auf Minimalmedien ohne Produktion von Nebenprodukten (z.B. Laktat) oder immunogenen Zellwandbestandteilen (z.B. LPS) erfolgen. Im Gegensatz zu beschriebenen Metabolic Engineering Ansätzen stand in diesem Projekt nicht der Produkttiter, sondern das Molekulargewicht als Optimierungskriterium im Vordergrund. Produkttiter über 7 g/L sind durch die hohe Viskosität des Fermentationsmediums nur mittels geeigneter Rührtechnik (z.B. Xanthan Rührer) zu erreichen.

3.3.1 Arbeitspaket 15 (AP15)

Die Aufgabe im AP15 war die Erstellung einer Hyaluronsäure produzierenden Hefe auf Basis der natürlichen Stoffwechselwege; dazu sollten die Gene *hasA* (HA-Synthase) und *hasB* (UDP-Glucose Dehydrogenase) aus *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* rekombinant exprimiert werden.

Ergebnisse: Codon-optimierte Versionen von *hasA* (szHA-Synthase, szHAS) und *hasB* (UDP-Glc Dehydrogenase, szUGDH) Genen aus *Streptococcus zooepidemicus* wurden in das Genom von *Saccharomyces cerevisiae* integriert und die Expression verifiziert. Als alternative Synthasen wurden die HAS2-Gene aus dem Nacktmull (*hghas2*), dem Krallenfrosch (*xlhas2*) und aus dem Hahn (*gghas2*) für *S. cerevisiae* codon-optimiert und von GeneArt Life Technologies synthetisiert. Die Integration der Synthasen in das Hefegenom wurde abgeschlossen und die Expression wurde überprüft. Für alle Gene außer *hghas2*

konnte Expression nachgewiesen werden. Die Aktivität von HasB konnte über die Reduktion von NAD zu NADH und Messung der Extinktion bei 340 nm in allen Stämmen gezeigt werden (**Abb. 3.3.2**).

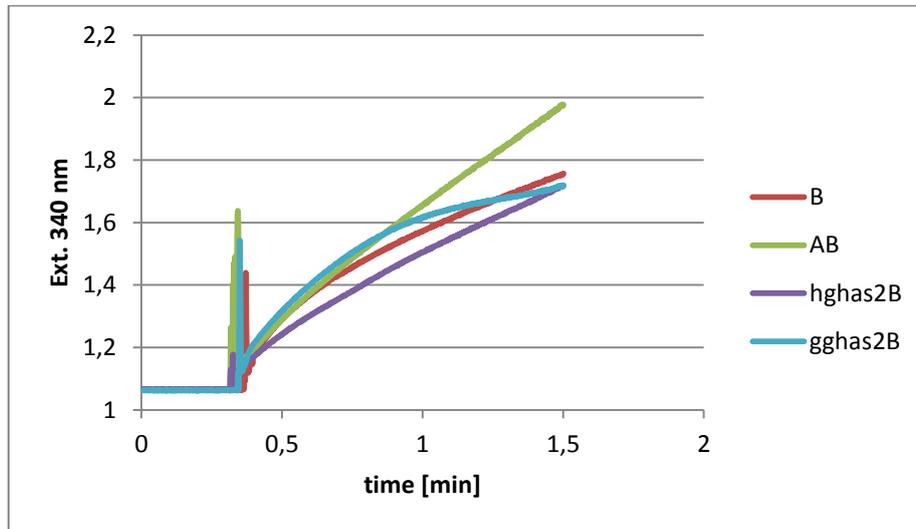


Abbildung 3.3.2: Aktivität von HasB in den vier Stämmen mit HasB und jeweils unterschiedlicher HA-Synthase.

Die Überprüfung der *in vitro* Aktivität der HA-Synthasen nach Zellaufschluss ergab, dass nur das prokaryotische Enzym (HasA) HA synthetisiert (**Abb. 3.3.3**). Keine der HA-Synthasen zeigte HA-Produktion mit Sekretion in den Zellüberstand. Die nicht nachweisbare Aktivität der eukaryotischen HA-Synthasen liegt möglicherweise an der Missfaltung der Proteine und an nicht-optimalen Versuchsbedingungen der Enzymaktivitätsbestimmung. Das hätte eine fehlende und/oder sehr geringe HA-Produktion zur Folge. Zur Klärung wurden die Translation und Lokalisierung mittels Fusionsproteine überprüft.

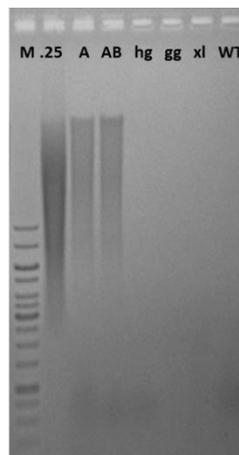


Abbildung 3.3.3: *In vitro* Aktivität der pro- und eukaryotischen HA-Synthasen. **M:** Genereller 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific), **A, AB:** HasA; **hg:** hgHAS2; **gg:** ggHAS2; **xl:** xlHAS2; **WT:** *S. cerevisiae* Stamm ohne Synthase.

Es wurden sowohl C- als auch N-terminale Fusionskonstrukte der HAS Enzyme HasA (prokaryotisch) und xlHAS2 (eukaryotisch) mit GFP hergestellt. Die Lokalisationsexperimente zeigen, dass die HAS-GFP-Fusionsproteine beider HA-Synthasen im Cytoplasma und nicht, wie angestrebt, in der Zytoplasma-Membran lokalisiert sind (**Abb. 3.3.4**).

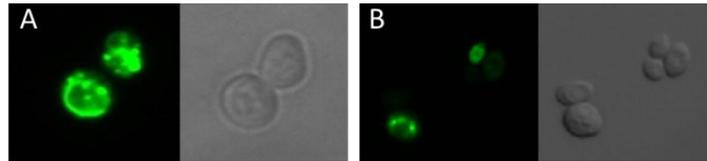


Abbildung 3.3.4: Lokalisation von szHasA (A) und xIHAS2 (B), überprüft durch C-terminale Fusion der Synthasen mit GFP.

Diskussion: Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl *hasA* als auch *hasB* in *S. cerevisiae* funktional exprimiert werden. Eine HA-produzierende Hefe wurde aber nicht etabliert. Der Grund liegt wahrscheinlich darin, dass die Synthase nicht, wie geplant, in der Plasmamembran lokalisiert und damit die Sekretion von HA in den Zellüberstand nicht nachweisbar ist. Die daraufhin alternativ untersuchten eukaryotischen Synthasen, die unter nativen Bedingungen vom Krallenfrosch bis zum Hahn HA während der Synthese über die Zellmembran in den intrazellulären Raum sekretieren, zeigten keine *in vitro*-Aktivität in der Hefe. Mögliche Gründe hierfür sind zahlreich und können unter anderem an der wenig sensitiven Nachweismethode mittels Agarose-Gelelektrophorese liegen. In unserem Antrag haben wir uns auf eine Publikation von 1996 bezogen, in der die *in vitro* Aktivität von xIHAS2 (Krallenfrosch) in *S. cerevisiae* nachgewiesen wurde [13]. Allerdings wurden in dieser Arbeit radioaktive Substrate eingesetzt, um die Nachweisgrenze deutlich zu senken. Dies war für unser Projekt nicht zielführend, da eine so geringe Enzymaktivität, die diese Nachweisgrenze nötig macht, für eine Produktion nicht ausreichend wäre.

Meilenstein 5 (MS 5): HA produzierende Hefe

Der Meilenstein 5 wurde nicht erreicht: *S. cerevisiae* ist kein geeigneter Wirt für eine effiziente HA-Produktion. Aus diesem Grund wurden für die Arbeitspakete 17 und 18 andere Mikroorganismen ausgewählt.

Fazit: *S. cerevisiae* ist kein geeigneter Wirt für eine effiziente HA-Produktion. Es wurden mögliche Ursachen für die fehlende HA-Produktion überprüft (Expression, Aktivität und Lokalisation der Synthasen). Weder die prokaryotische noch die eukaryotischen Synthasen sind in der Zytoplasmamembran lokalisiert, sodass der gewählte Ansatz nicht erfolgreich war.

3.3.2 Arbeitspaket 16 (AP16)

Die Aufgabe im AP16 war die Erstellung einer Hyaluronsäure produzierenden Hefe auf Basis des neuen *in vitro* Stoffwechselweges aus dem Arbeitsprogramm 5.1.

Ergebnisse: Ziel dieses Arbeitspaketes war es, Saccharose und *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) als alternative Kohlenstoffquellen, die auf nachwachsenden Rohstoffen beruhen, für die HA-Synthese einzusetzen. Hierzu wurden Methoden erarbeitet, um die Enzymmodule aus AP1 und AP2 einzeln in Hefe einzubinden und ihre Umsetzbarkeit nachzuweisen. Für das „SuSy-Modul“ (AP1), das die direkte Synthese von UDP-Glc aus Saccharose ermöglicht, wurde in *S. cerevisiae* CEN.PK 111-61A zunächst die Invertase *SUC2* deletiert. Da der Stamm anschließend immer noch auf Saccharose wachsen konnte, wurden auch die Maltasen kodierende Gene deletiert, da diese auch Saccharose spalten können. Auch dieser Stamm konnte weiterhin Saccharose verstoffwechseln. Schließlich wurde ein alternativer Stamm mit bereits ausgeknockter Invertase ausgewählt. Dieser wurde aus dem European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional Analysis (Euroscarf) beschafft

(*S. cerevisiae* BY4742 Δ SUC2). In das Genom dieses Stammes wurden die Gene von SuSy und HasB (UGDH) integriert.

Für die Nutzung von GlcNAc (aus z.B. Chitin) als Kohlenstoffquelle sind eine GlcNAc-1-Phosphat Kinase (NahK), die native UDP-GlcNAc-Pyrophosphorylase (Qri1) und ein geeigneter GlcNAc-Transporter (CaNAG4) [14] nötig. Zur Realisierung des Enzymmoduls in Hefe wurden die Gene für NahK (AP2) und CaNAG4 (aus *C. albicans*) in das Genom von *S. cerevisiae* BY4742 integriert.

Mit Bezug zu den erfolgreichen Expressionsversuchen der HA-Synthasen in den Arbeitsprogrammen 5.1 und 5.2 wurde weiterhin eine Planung zur Nutzung des Stoffwechselwegs von *E. coli* auf der Basis von Saccharose und GlcNAc durchgeführt. Das Einbringen der Enzymmodule ist auch in *E. coli* möglich (**Abb. 3.3.5**).

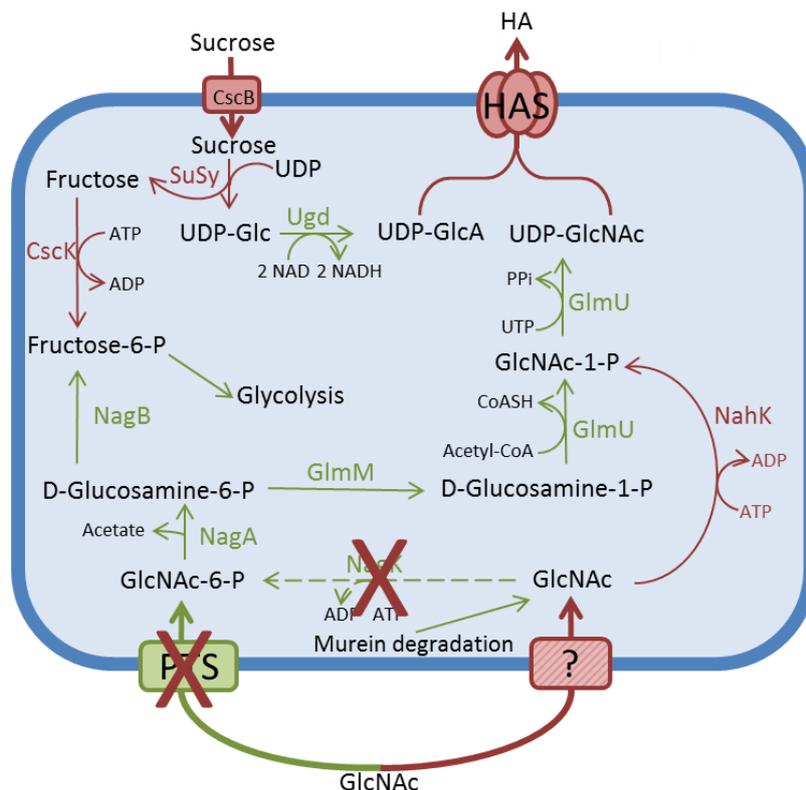


Abbildung 3.3.5: Modell für *E. coli* als HA-Produzent mit neuen Enzymmodulen aus AP1 und AP2. **Grün:** native Enzyme. **Rot:** einzubringenden Enzyme; CscB: Sucrose permease; CscK: Fructokinase; GlmM: Phosphoglucosamin Mutase; GlmU: *N*-Acetylglucosamin-1-phosphat Uridyltransferase und Glucosamin-1-phosphat Acetyltransferase; HAS: HA-Synthase; NagA: *N*-Acetylglucosamin-6-phosphat Deacetylase; NagB: Glucosamin-6-phosphat Desaminase; NahK: *N*-Acetylglucosamin 1-Kinase; PTS: Phosphotransferase System; SuSy: Sucrose Synthase; Ugd: UDP-Glucose Dehydrogenase.

Dieses Design erfordert noch einzelne Modifikationen, die in Hefe nicht notwendig sind. So muss bei der Verwendung von *E. coli* BL21(DE3) eine Fructokinase eingebracht werden, um die bei Saccharose Spaltung freiwerdende Fructose zu phosphorylieren. Andernfalls wäre ein Wachstum auf Saccharose als einzige C-Quelle nicht möglich. Außerdem muss die C-6-Phosphorylierung von GlcNAc verhindert werden, damit dieses als Substrat für NahK zur Verfügung steht. Da die GlcNAc-Aufnahme in *E. coli* über ein Phosphotransferase-System mit gleichzeitiger Phosphorylierung erfolgt [15], muss dieser Transportweg deletiert werden. Außerdem wird ein Aufnahmesystem für GlcNAc benötigt. Da bisher kein bakterieller

GlcNAc-Transporter bekannt ist, muss auf ein eukaryotisches System zurückgegriffen werden, z.B. CaNAG4 aus *C. albicans*.

Diskussion: Es konnte ein Chassis (*S. cerevisiae* Stamm) für die potentielle Synthese von Glucuronsäure (GlcA) und *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc)-haltigen Polysacchariden (wie z.B. Heparin) aufgebaut werden. Wie in AP15 dargestellt, ist eine HA-Synthese allerdings nicht möglich. Da der Invertase (Δ SUC2) und Maltase-Knockout nicht zu einem Sucrose-negativen CEN.PK-Stamm führten, ist es möglich, dass dieser noch weitere SUC-Gene enthält, die bisher noch nicht identifiziert sind. Es sind mehrere verschiedene SUC-Gene bekannt, die sich in Subtelomer-Regionen befinden [16]. Von *S. cerevisiae* CEN.PK ist zur Zeit nur eine Shotgun-Sequenz vorhanden, in der zum Teil diese Regionen fehlen [17]. Daher konnte die Lokalisierung von weiteren SUC Genen nicht weiter untersucht werden. Ein alternativer Sucrose-negativer Stamm konnte beschafft werden, jedoch ist in diesem das MAL-Regulatorprotein defekt [18]. Dieses reguliert den Promotor des α -Glucosid-Transporters Agt1 [19], welcher für die Saccharose-Aufnahme unerlässlich ist. Ein Austausch des nicht-funktionalen Promotors durch einen konstitutiven Promotor kann dieses Problem jedoch lösen. Die bei der Umwandlung von Saccharose zu UDP-Glucose entstehende Fructose sollte ausreichen, um das Zellwachstum mit Saccharose als einzige Kohlenstoffquelle zu ermöglichen. Der funktionale Nachweis des „NahK-Moduls“ kann nach Deletion des nativen UDP-GlcNAc-Syntheseweges erfolgen. Durch die Deletion ist das Modul mit dem Wachstum gekoppelt (bei gleichzeitiger Glucose-Supplementation): die Zellen können nur wachsen, wenn aufgenommenes GlcNAc über NahK und Qri1 zu UDP-GlcNAc umgewandelt wird. Es gibt zwar Hinweise auf GlcNAc-Aufnahme über Hexose-Transporter in *S. cerevisiae* [20], es kann jedoch nicht davon ausgegangen werden, dass die Aufnahme in genügender Menge erfolgt. Daher wurde entschieden noch einen GlcNAc-Transporter (CaNAG4) aus *Candida albicans* einzubringen, der nachweislich in *S. cerevisiae* funktioniert [14]. Alternativ wurde ein Design für *E. coli* erarbeitet, welches die Verwendung von Sucrose und GlcNAc erlaubt.

Fazit: Die Vorgehensweise für das Einbringen der Enzymmodule in die Bäckerhefe hat sich bewährt. Die Verwendung von alternativen und zum Teil für Hefe unüblichen Kohlenstoffquellen wurde erschlossen, und es konnten neue Wege der Bereitstellung aktivierter Zucker etabliert werden. Dadurch entsteht ein neues Chassis, das zur Produktion anderer Polysaccharide auf Basis von UDP-GlcNAc und UDP-GlcA dienen kann. Hierbei ist z.B. Heparosan (Vorläufer von Heparin) zu nennen, das bereits rekombinant in Bakterien hergestellt wird [21].

3.3.3 Arbeitspaket 17 (AP17)

Die Aufgabe im AP17 war die Erstellung und Durchmusterung einer Hyaluronsäure-Synthase Bibliothek zur Herstellung von hochmolekularer Hyaluronsäure in Bäckerhefe (auf Basis von AP 15).

Ergebnisse: Die Durchmusterung putativ neuer HA-Synthasen erfolgte durch Expression der Gene in *E. coli* und Milchsäurebakterien in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Professor Guhan Jayaraman am Indian Institute of Technology Madras (IITM) in Chennai, Indien. Die molekularbiologischen Arbeiten, die *in vitro* Testung der HA-Synthasen und Stammcharakterisierung erfolgte am iAMB; die Fermentation und Molekulargewichtsbestimmung von HA wurde am IITM durchgeführt (siehe Erläuterung im Text). Kürzlich wurde das Genom von *Streptococcus iniae* sequenziert. Es konnte ein HA-Synthase-Gen in diesem Stamm identifiziert werden. Der Vergleich von HA-Synthasen aus verschiedenen *S. pyogenes*-Stämmen zeigte nur sehr geringfügige Sequenzunterschiede.

Es wurden insgesamt 5 verschiedene Synthesen identifiziert und für die weitere Charakterisierung ausgewählt, wobei die Synthesen von *S. equi* subsp. *equi* und *S. equi* subsp. *zooepidemicus* nahezu identisch sind (**Abb. 3.3.6**).

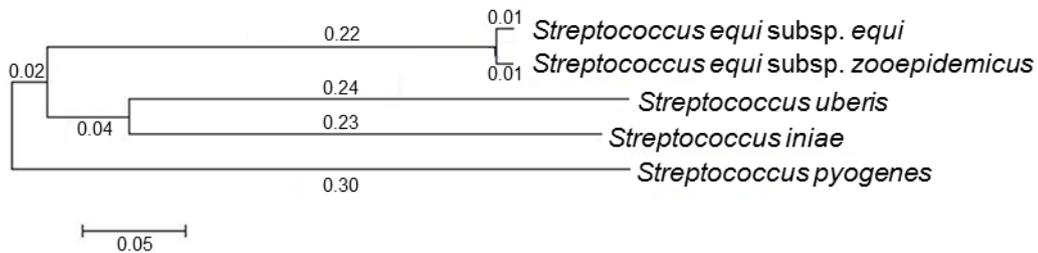


Abbildung 3.3.6: Untersuchte HA-Synthesen aus Streptokokken.

Die genomische DNA der Stämme (außer *S. zooepidemicus*) wurde aus klinischen Isolaten gewonnen und wie geplant vom nationalen Referenzzentrum für Streptokokken am Uniklinikum Aachen bereitgestellt. Die Synthese-Gene wurden PCR-amplifiziert, in pET3a kloniert und in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Anschließend wurde die Aktivität der Synthesen *in vitro* überprüft (**Abb. 3.3.7**).

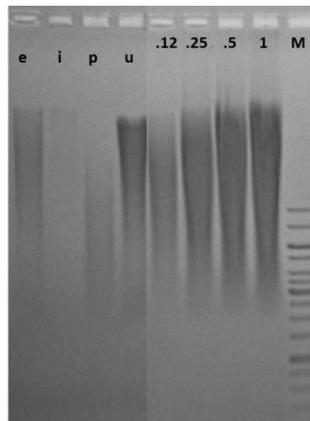


Abbildung 3.3.7: *In vitro* Aktivität von neuen HA-Synthesen exprimiert in *E. coli*. **e:** *S. equi* subsp. *equi*; **i:** *S. iniae*; **p:** *S. pyogenes*; **u:** *S. uberis*; .12, .25, .5, 1: Kommerzielle HA in verschiedenen Konzentrationen (0,12 bis 1 mg/mL); **M:** Generuler 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific).

Herr Jayaraman im IITM ist ein ausgewiesener Experte für die HA-Synthese mit *Lactococcus*, einem GRAS Organismus [22]. Nach erfolgreicher Klonierung der Gene wurden die Plasmide für Expression der unterschiedlichen HA-Synthase Gene im Milchsäurebakterium *Lactococcus lactis* sowie die Synthese und Sekretion von HA ins Kulturmedium getestet (iAMB). Die aktiven Stämme wurden zum IITM geschickt und dort fermentiert. Die Ergebnisse des IITM sind in der nachfolgenden Tabelle 3.3.1 dargestellt. Eine Verifizierung der Ergebnisse wird gerade erarbeitet (Frau Sandra Schulte vom iAMB reist für 4 Wochen zum IITM).

Tabelle 3.3.1: Analyse der synthetisierten HA aus dem Kulturmedium von *Lactococcus lactis*. Es wurden HA-Synthasen aus verschiedenen *Streptococcus* Stämmen des Referenzzentrums für Streptokokken des Uniklinikums Aachen getestet (durch Partner iAMB). Die Analyse des Molekulargewichts der HA erfolgte mit GPC (am IITM).

Streptokokken Stamm	HA MW (MDa), statische Batchkultur mit 5g/L Glucose	HA MW (MDa), Fermentation mit 30g/L Glucose
<i>S. iniae</i>	1.4± 0.2	2.1±0.2
<i>S. uberis</i>	1.1± 0.1	2.3±0.1
<i>S. equisimilis</i>	1.1± 0.1	1.3±0.4
<i>S. zooepidemicus</i>	1.2± 0.1	0.9±0.1
<i>S. pyogenes</i>	HA nicht detektierbar	3.7±0.1

Diskussion: Es wurde eine Anzahl von Synthasen ausgewählt und im Hinblick auf Unterschiede im Molekulargewicht der produzierten HA-Polymere untersucht. Dies erfolgte statt in Bäckerhefe in *E. coli* (**Abb. 3.3.7**) und *L. lactis* (**Tab. 3.3.1**). *In vitro* Aktivitätsversuche gaben erste Hinweise auf eine Synthese-abhängige Bildung von HA mit unterschiedlichem Molekulargewicht. Im den *in vitro* Ansatz werden die HA-Synthasen unter Substratsättigung getestet. Im *in vivo* Ansatz mit *Lactococcus lactis* als Produktionsstamm spielen Faktoren wie Medium, pH und Kohlenstoffquelle eine Rolle. Dabei kann unter Fermentationsbedingungen geprüft werden, ob und wie sich das Molekulargewicht der produzierten HA in Abhängigkeit der HA-Synthasen unterscheidet. Das ist ein zentrales Ziel des Projektes. Die Ergebnisse zeigen, dass *L. lactis* mit der HA-Synthase aus *S. pyogenes* ein deutlich höhermolekulares HA bildet (**Tab. 3.3.1**). Gleichzeitig ist die Menge so gering gewesen, dass eine Molekulargewichtsbestimmung aus Schüttelkolben nicht möglich war.

Fazit: Die Bewertung von neuartigen HA-Synthasen aus Streptokokken war erfolgreich. Die *in vitro* Testung der mit *E. coli* exprimierten HA-Synthasen erbrachte bereits Hinweise auf Unterschiede im Molekulargewicht. Die Verwendung von *L. lactis* als Ganzzellsystem wurde etabliert. Die HA-Produktion mit diesem rekombinanten GRAS-Organismus ist möglich und eignet sich zur Charakterisierung neuer HA-Synthasen unter Fermentationsbedingungen.

3.3.4 Arbeitspaket 18 (AP18)

Die Aufgabe im AP18 war die iterative Optimierung der Bäckerhefe für die Herstellung von hochmolekularer Hyaluronsäure.

Ergebnisse: Anstelle von Bäckerhefe wurde *L. lactis* für die Produktion von hochmolekularem HA optimiert. *L. lactis* als Produktionswirt wurde in einer vorhergehenden Arbeit am IITM durch die Deletion des Lactat-Dehydrogenase kodierenden Genes *ldh* bereits optimiert [23]. Ein solches Milchsäurebakterium hat als metabolisches Endprodukt nicht mehr Milchsäure, sondern Ethanol und Essigsäure. Hierdurch erhöht sich die Ausbeute an ATP, da die vorhandene Kinase bis zu 3 anstatt 2 ATP pro Mol Glukose ermöglicht. Dieser Stammhintergrund wurde am IITM in der oben zitierten Publikation mit der HA-Synthase aus *S. zooepidemicus* ausgerüstet. Eine deutlich erhöhte Produktion von HA mit hohem

Molekulargewicht wurde nachgewiesen, was auf die Entfernung jeglicher metabolischer Limitation hindeutet. Dies kommt den *in vitro* Ergebnisse nahe. Dieser Stammhintergrund soll nun für die Charakterisierung der bekannten und neuen Synthesen eingesetzt werden. Explizit, die Auswirkung der Stammoptimierung auf das HA Molekulargewicht ist eine im Moment laufende Charakterisierung (Mitarbeiterin der RWTH von November bis Dezember 2016 am IITM in Chennai).

Diskussion: Es konnte eine Alternative zu Hefe als Wirt für die Optimierung der HA-Produktion gefunden werden (siehe Meilenstein 5). Die neuartigen HA-Synthesen erlauben die Synthese von HA mit unterschiedlichem Molekulargewicht.

Fazit: Die Verwendung von *L. lactis* als Chassis für die HA-Synthese erlaubt auch weitere Optimierungen, um metabolische Limitationen des Molekulargewichtes zu minimieren.

3.4 Arbeitsprogramm 5.4 (GALAB): Produktcharakterisierung, Produktaufarbeitung und Fermentation

Ziel des **Arbeitsprogramms 5.4** war die Entwicklung einer Methode zur Charakterisierung der Hyaluronsäure (HA), die aus dem Fermentationsprozess gewonnen wurde (**Abbildung 3.4.1**).

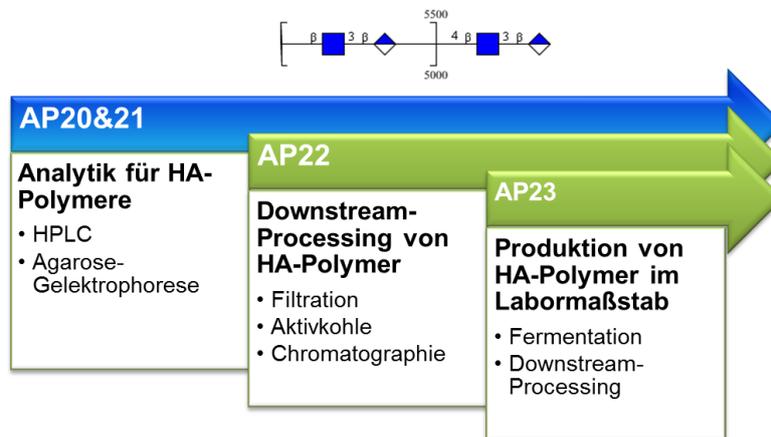


Abbildung 3.4.1: Übersicht der Arbeitspakete (AP) zum **Arbeitsprogramm 5.4**.

Die wichtigste Größe stellt die Molmasse sowie die Molmassenverteilung der HA dar. Für das Endprodukt wird eine präzise Methode auf Basis chromatographischer Methoden benötigt. Die aufgereinigte HA aus dem Fermentationsüberstand sollte über eine Größenausschluss säule (HPLC-SEC-RI) getrennt und mittels Brechungsindex bestimmt. Die chromatographischen Bedingungen, wie Salzgehalt der mobilen Phase und Porengröße des Säulenmaterials sollten dafür optimiert werden. Besondere Schwierigkeit stellt die Verfügbarkeit von Standardsubstanzen dar. Die käuflich zu erhaltenden Standards sind meist Gemische, die zudem schlecht charakterisiert sind.

3.4.1 Arbeitspaket 20 (AP20)

Die Aufgabe im AP 20 war die Etablierung einer Methode zur präzisen Bestimmung der Molmasse sowie die Molmassenverteilung der HA mittels HPLC-SEC und Detektion mittels Brechungsindex, die Festlegung eines Molekulargewichts-HA-Standards sowie die Anwendung auf HA-Polymere, die mit optimierten rekombinanten Produktionsstämmen (AG Blank) oder mit *in vitro* Synthese (AG Elling) hergestellt wurden.

Ergebnisse und Diskussion: Die wichtigsten Kenngrößen für HA Polymere stellen die Molmasse und die Molmassenverteilung dar. Für das Endprodukt wird eine präzise Methode auf Basis chromatographischer Methoden benötigt. Die gereinigte HA wird dazu über eine Größenausschluss säule getrennt und mittels Brechungsindex detektiert (GPC-RI). Die chromatographischen Bedingungen wie Salzgehalt der mobilen Phase und Porengröße des Säulenmaterials wurden dafür optimiert. Besondere Schwierigkeit stellte die Verfügbarkeit von zertifizierten HA-Standards dar. Die käuflich erhältlichen Standards waren meist Gemische, die zudem schlecht charakterisiert waren. Der kommerziell erhältliche Standard (*HA-ladder*) wurde zu Beginn eingesetzt, konnte aber aufgrund seiner geringen Molmasse von max. 1 MDa nicht weiter zur Optimierung der Methode eingesetzt werden. Für alle Versuche wurden drei HA-Pharma-Produkte mit 0,6 MDa, 1,6 MDa und 2 MDa eingesetzt.

Versuche, von einer pharmagrade HA definierte Fraktionen zu isolieren, waren nicht erfolgreich.

Die weiteren Untersuchungen konzentrierten sich auf die aufwendige Analytikmethode mittels GPC. In der Literatur waren keine geeigneten Säulen beschrieben. Agarose-Säulen waren von der Trennleistung nicht ausreichend. Es wurden daher hochporöse Methacrylat-Polymer-Beads eingesetzt. Die Beads wurden in eine 30 cm lange Säule gepackt. Als Detektor wurde ein RI-Detektor eingesetzt.

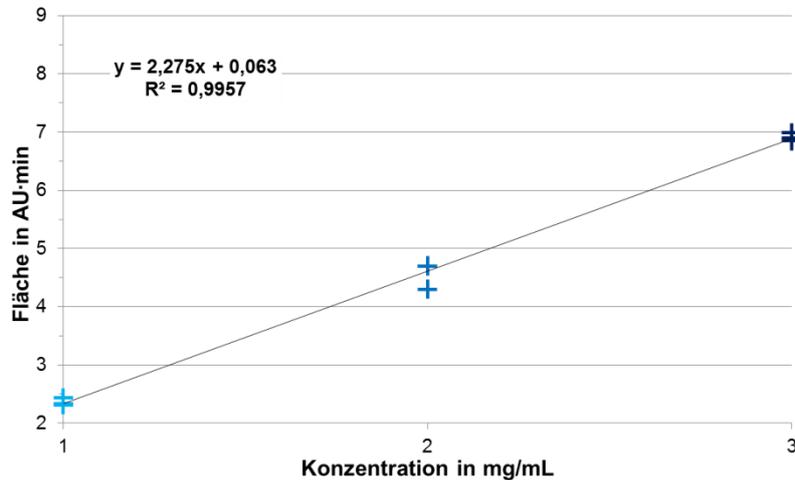


Abbildung 3.4.2: Bestimmung der Konzentration mittels RI-Detektor (HA = 1,2 MDa).

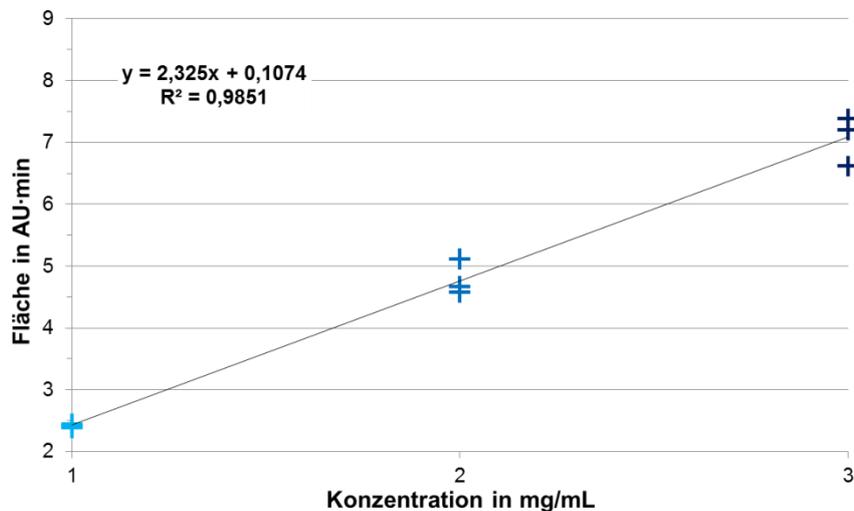


Abbildung 3.4.3: Bestimmung der Konzentration mittels RI-Detektor (HA = 2,1 MDa).

Die Ergebnisse zeigen eine lineare Korrelation der HA-Konzentration im Bereich von 1-3 mg/ml (**Abb. 3.4.2** und **Abb. 3.4.3**). Höhere Konzentration konnten aufgrund der hohen Viskosität der HA nicht getestet werden. Die Methode wurde auf ihre Reproduzierbarkeit getestet. Dazu wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die GPC-Chromatogramme (**Abb. 3.4.4**) für den 0,35 MDa HA-Standard liegen alle übereinander, was einer hohen Reproduzierbarkeit der Methode entspricht. Die Reproduzierbarkeit für den 1,6 MDa Standard ist dagegen geringer (**Abb. 3.4.5**). Dies könnte an Unterschieden der Molmassenverteilung der HA liegen. Die 0,3 MDa HA zeigt einen symmetrischen Peak, was auf eine normalverteilte Molmasse deutet, wohingegen die 1,6 MDa HA einen

unsymmetrischen Peak zeigt, bei dem niedrige Molmassenbestandteile langsam von der Säule „tailen“.

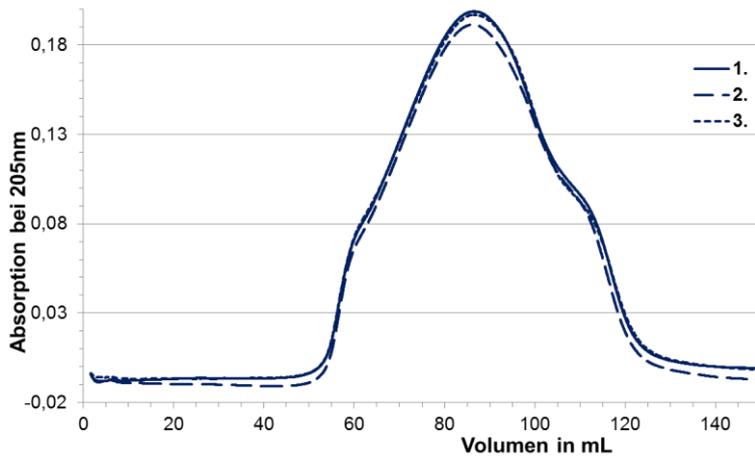


Abbildung 3.4.4: Reproduzierbarkeit der GPC-Methode. Dreifachbestimmung 3 mg/mL 0,35 MDa HA mit 1 mL/min.

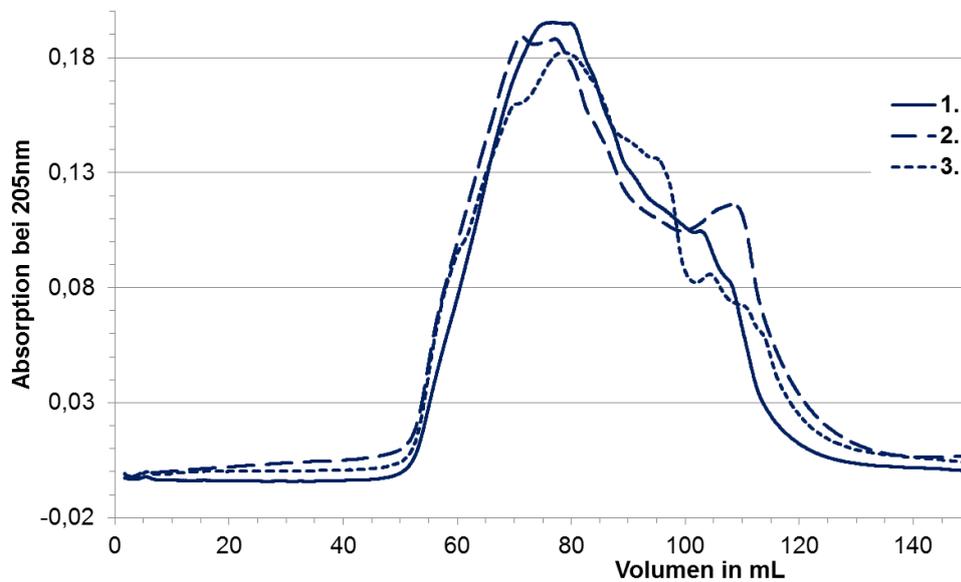


Abbildung 3.4.5: Reproduzierbarkeit der GPC-Methode. Dreifachbestimmung 3 mg/mL 1,6 MDa HA mit 1 mL/min.

Das Peakmaximum der eingesetzten HA wurde nun verglichen. Je kürzer die Retentionszeit, desto höher sollte die Molekularmasse der HA sein (**Abb. 3.4.6**). Das Peakmaximum für die 0,35 MDa HA lag bei einer Retentionszeit von 86 min und lag deutlich höher als die HA-Standards mit einer Molmasse von 1,2 – 2,1 MDa. Die Retentionszeiten der HA-Standards von 1,2-2,1 MDa lagen zwischen 70 und 81 min, ohne dass ein Unterschied der Standards zu erkennen war. Eine Optimierung der Konzentration und der Fließgeschwindigkeit ergaben keine Verbesserung. Dies deutet darauf hin, dass die Trennleistung der gepackten Methacrylatsäule für HA mit einer Molmasse größer als 1,2 MDa nicht ausreicht.

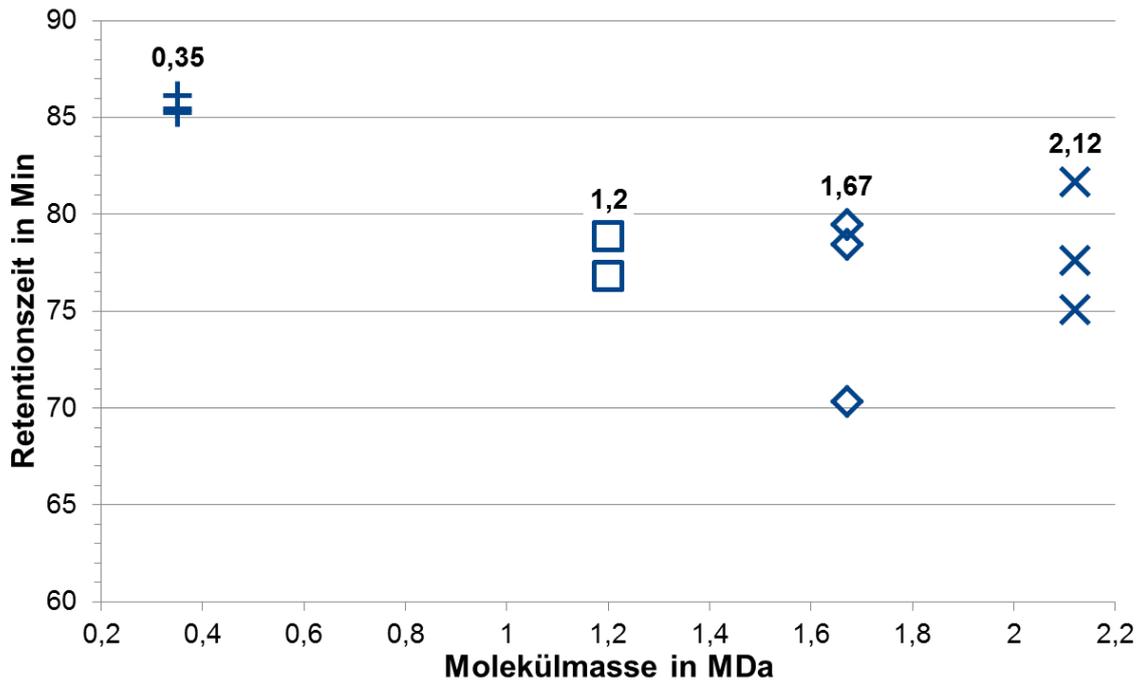


Abbildung 3.4.6: Retentionszeiten der Peakmaxima in Abhängigkeit der HA-Molmasse (Methacrylatsäule, 30 cm).

Eine genaue Molmassenbestimmung war somit mittels Retentionszeitenvergleich auf einer gepackten GPC-Säule nicht möglich. Es musste nun ein anderes Verfahren herangezogen werden, dass die Molmasse unabhängig von einer chromatographischen Trennung der HA ermöglicht (**Abb. 3.4.7**). Die dynamische Lichtstreuung (DLS) bietet eine solche Möglichkeit. Über eine Kleinwinkelstreuung von 7° erhält man so Aussagen über die genaue Molmasse. Die Messungen wurden an einer Viscotek GPCmax, gekoppelt mit einem Viscotek TDA 305 Detektormodul (RI- LALS und RALS), durchgeführt. Als Trennsäule wurden eine A6000M und eine A7000 in Reihe geschaltet. Die A6000M ist eine *mixed bed*-Säule bis max. 20 MDa, die A7000 ist eine *single pore*-Säule bis max 500 MDa.

Es war erforderlich, dass die eingesetzte HA-Reinheit möglichst hoch war. Dies war bei den Standards gegeben. Probenmaterial vom Projektpartner RWTH Aachen musste zunächst aufgereinigt und durch einen $0,2 \mu\text{m}$ Spritzenfilter gedrückt werden. Die Proben konnten rein wässrig oder leicht gepuffert aufgegeben werden. Eine zu hohe Salzfracht störte die Ergebnisse des RI-Detektors. Das Injektionsvolumen betrug $80 \mu\text{l}$ bei einer Probenvorlage von mindestens $300 \mu\text{l}$. Die minimale Konzentration, die gemessen werden konnte, betrug $0,033 \text{ mg/ml}$. Bei kleineren Gehalten war der Fehler der Integration der Ergebnisse zu hoch. Es empfahl sich, dass die HA-Proben 48 Stunden vor der Messung angesetzt wurden, damit die HA sich im Wasser gut verteilen konnte. Ein Rühren oder zu starkes Mixen der Proben führte zu Störungen bei der Messung.

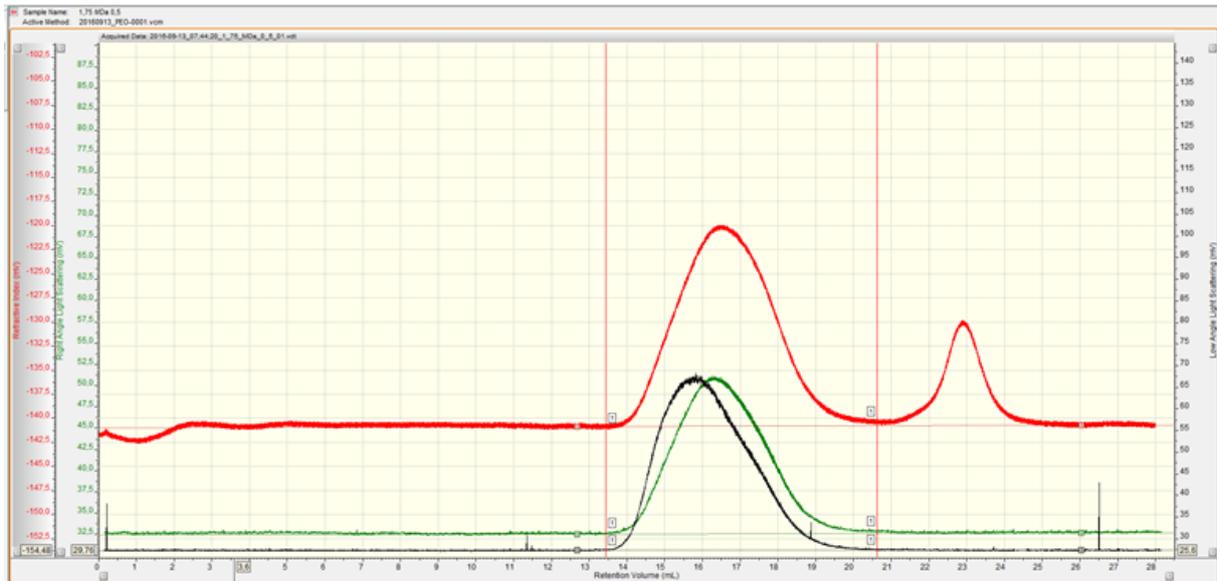


Abbildung 3.4.7: GPC-RI-DLS-Messung einer 1,75 MDa HA. Flussrate 0,35 mL/min; Temperatur 35 °C; HA-Konzentration 0,5 mg/mL; Standard PEO 1 mg/ml; Dreifachdetektion (RI, RALS, LALS) rot: Brechungsindex; grün DLS-Signal 90°, schwarz DLS 7°.

Mit der entwickelten Methode wurden nun verschiedene HA-Standards und Proben vom Projektpartner RWTH-Aachen gemessen (**Abb. 3.4.8**). Als Kalibrierstandard wurde PEO eingesetzt.

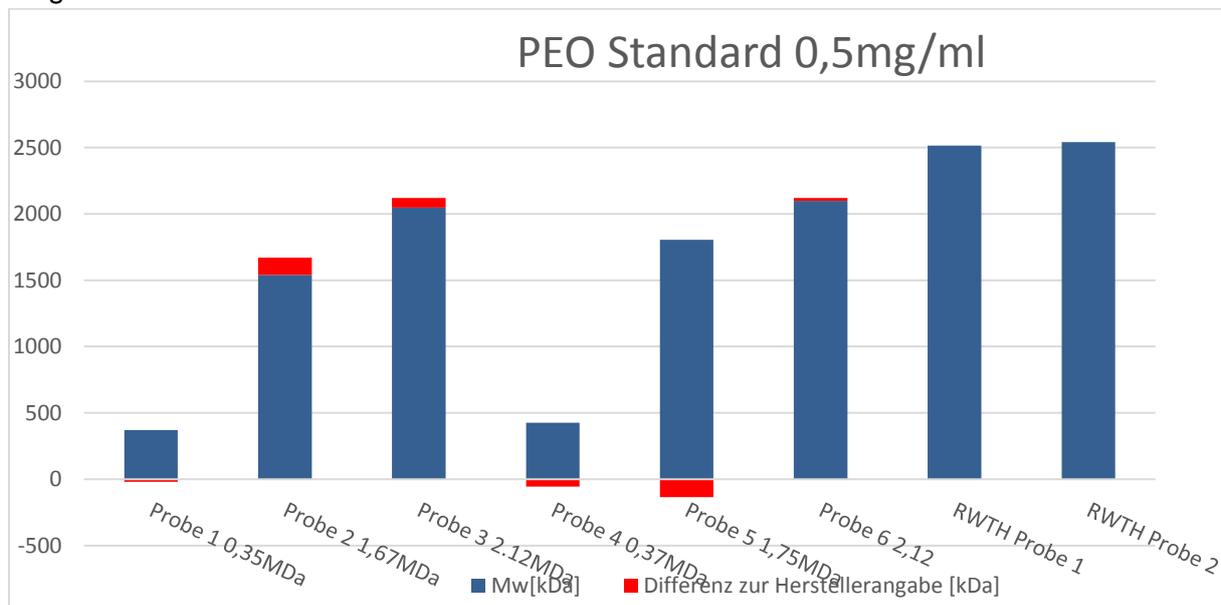


Abbildung 3.4.8: Bestimmung der Molmasse von HA-Standards und Proben der RWTH-Aachen. Rot markiert sind die Abweichungen zu den Herstellerangaben.

Die Ergebnisse der HA-Standards zeigen, dass die Methode sehr gut die Molmasse von HA von niedrigen bis sehr hohen Molmassen bestimmen kann (**Tab. 3.4.1**). Die gemessenen Gehalte stimmen mit den Herstellerangaben gut überein. Die Abweichungen gegenüber den Soll-Werten liegen zwischen 1 und 7%. In der 1,7 MDa HA-Proben wurde eine höhere Abweichung von 15% ermittelt. Die Abweichungen sind damit zu erklären, dass keine Information über die genaue Messmethode der Hersteller vorliegt.

Tabelle 3.4.1: Zusammenfassung der Ergebnisse. Der Soll-Wert bezieht sich auf die Herstellerangaben.

	0,35 MDa*	0,37 MDa*	1,67 MDa*	1,75 MDa*	2,12 MDa*	2,12 MDa*	RWTH 1**	RWTH 2**
Soll-Wert [MDa]	0,35	0,37	1,67	1,75	2,12	2,12		
Gemessener Wert [MDa]	0,37	0,43	1,54	1,81	2,05	2,09	2,51	2,54
Dif. [MDa]	-0,02	-0,06	0,13	-0,06	0,07	0,03		
Dif [%]	5,71	7,78	3,40	15,14	7,71	1,04		

Die Proben des Projektpartners RWTH Aachen stammen aus *in vitro* Versuchen. Die Molmasse der hergestellten HA beträgt 2,5 MDa und liegt damit um ca. 0,4 MDa höher als die höchsten verfügbaren pharmagrade HA-Produkte. Im RI-Detektor (rotes-Signal) ist zu erkennen, dass neben der HA noch weitere niedermolekulare Substanzen in der Probe vorliegen (**Abb. 3.4.9**). Die Molmassenbestimmung wird dadurch nicht gestört (grünes, schwarzes Signal der DLS).

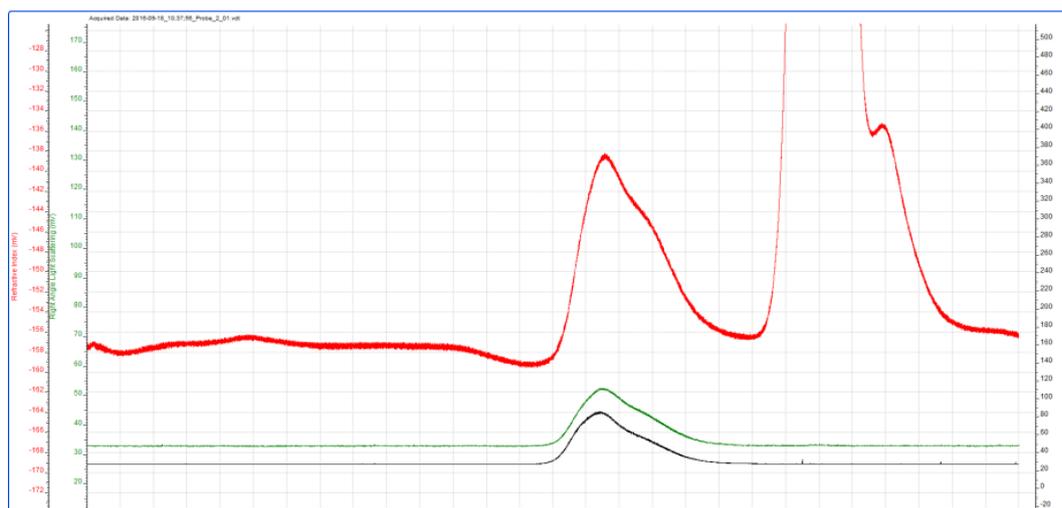


Abbildung 3.4.9: Chromatogramm einer HA-Probe des Projektpartners RWTH Aachen (Molmasse 2,5 MDa).

Fazit: Es wurde eine leistungsstarke Methode zur Bestimmung der Molmasse von Hyaluronsäure entwickelt. Die Methode wurde erfolgreich auf reale Proben angewendet. Die ermittelten HA-Molmassen lagen mit über 2,5 MDa deutlich höher als die am Markt erhältlichen pharmagrade HA-Produkte.

3.4.2 Arbeitspaket 21 (AP21)

Die Aufgabe im AP21 war die Etablierung einer Methode zur schnellen Analyse von HA-Polymergrößen auf der Basis einer Agar-Gelelektrophorese und deren Anwendung für das Screening von Mutanten (AG Schwaneberg, AG Blank) und die Produktanalyse für *in vitro* Synthesen (AG Elling).

Ergebnisse und Diskussion: **Abbildung 3.4.10** zeigt ein Agarosegel für verschiedene HA-Proben unterschiedlicher Kettenlänge (Kettenlänge nach Herstellerangaben). Als Kettenlängenmarker wurde ein DNA-Standard eingesetzt. Der DNA-Standard erwies sich als nicht aussagekräftig für eine genaue Kettenlängen-Charakterisierung der HA. Die HA ließ sich mit *stains-all* sehr gut anfärben und eine Verdünnungsreihe zeigte eine gute

Reproduzierbarkeit des Tests. Nachteilig war, dass eine Trennung von HA größer als 1,5 MDa nicht gelungen ist. Eine weitere Verdünnung des Agarosegels auf unter 10% war nicht möglich. Die Methode sowie die Pharma-Standards wurden an die Partner der RWTH Aachen übergeben.

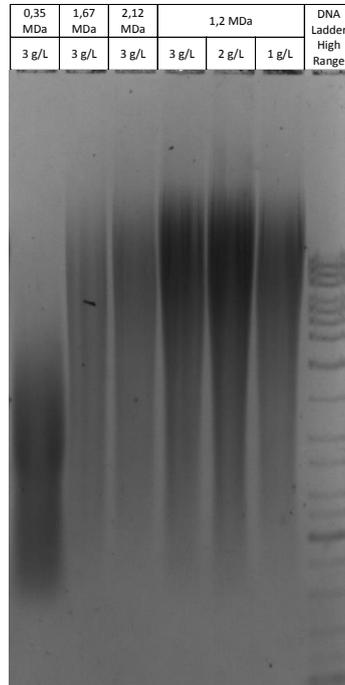


Abbildung 3.4.10: Agarosegel von Hyaluronsäure-Produkten (Kettenlänge nach Herstellerangaben).

Fazit: Die Entwicklung der Schnellmethode wurde abgeschlossen. Es wurden kommerziell verfügbare HA-Standards und ein qualifiziertes Testmaterial als Molekulargewichtsstandards verwendet. Anhand dieser Standards können Molekulargewichtsverteilungen in realen Proben >2 MDa bestimmt werden. Die Schnellmethode wird für das weitere Screening von Enzymvarianten und für die Analytik von *in vitro* Synthesen verwendet.

Meilenstein 7 (MS7): Chromatographische Methode und Schnelltest zur Charakterisierung von hochpolymerer Hyaluronsäure

Der Meilenstein 7 wurde erreicht: Es wurde eine Methode zur Analytik der HA Molmasse und der HA Polydispersität validiert und für reale Syntheseproben angewendet (MS1). Ebenso konnte die Agarose-Gelelektrophorese als Schnellmethode für die weitere Verwendung durch die Projektpartner der RWTH Aachen etabliert werden.

3.4.3 Arbeitspaket 22 (AP22)

Die Aufgabe im AP22 war die Entwicklung der Aufreinigung (Downstream Processing) der HA aus Fermentationen mit rekombinanten Produktionsstämmen (AG Blank).

Ergebnisse/Diskussion/Fazit: Das Arbeitspaket konnte nicht bearbeitet werden, da HA aus Fermentationen mit rekombinanten Hefestämmen nicht zur Verfügung standen. In Absprache mit den Partnern wurde beschlossen die Arbeitskraft auf die Entwicklung der HA-Analytik zu fokussieren.

3.4.4 Arbeitspaket 23 (AP23)

Die Aufgabe im AP23 war die Fermentation und Downstream-Processing ausgesuchter optimierter rekombinanter Produktionsstämme zur HA Synthese im Labormaßstab

Ergebnisse/Diskussion/Fazit: Das Arbeitspaket konnte nicht bearbeitet werden, da rekombinante Hefestämme für die HA Produktion nicht zur Verfügung standen. Fermentationen wurden im Rahmen der Kooperation der AG Blank mit dem IITM mit *Lactococcus lactis* durchgeführt (AP17). In Absprache mit den Partnern wurde beschlossen die Arbeitskraft auf die Entwicklung der HA-Analytik zu fokussieren.

Meilenstein 8 (MS 8): Fermentation und Downstream-Processing von hochpolymerer Hyaluronsäure im Labormaßstab

Der Meilenstein 8 wurde nicht erreicht. Für Fermentationen standen keine rekombinanten Hefestämmen zur Verfügung. Im AP17 (Arbeitsprogram 5.3) wurde *Lactococcus lactis* als Ganzzellsystem für die HA Synthese etabliert. Die HA-Produktion mit diesem rekombinanten GRAS-Organismus ist möglich und eignet sich zur Produktion von hochpolymerer HA unter Fermentationsbedingungen. Das Downstream-Processing wird Teil der fortlaufenden Arbeiten der AG Blank mit dem indischen Kooperationspartner sein.

3.5 Arbeitsprogramm 5.5 (IFU, Hamburg): Ökobilanzielle Bewertung des Vorhabens

Für die Herstellung von hochmolekularer Hyaluronsäure ist der Stand der Technik die Extraktion aus Hahnenkämmen sowie die Fermentation mit Streptococcus Stämmen. Im Projekt sollten beide mittels Ökobilanzierung (LCA) mit dem zu entwickelnden Ansatz mit rekombinanten Hefen verglichen werden. LCA ist eine ganzheitliche Bewertungsmethode. Durch die Einbeziehung der kompletten Wertschöpfungskette eines Produktes wird sichergestellt, dass unerwünschte Umwelteinflüsse nicht unbemerkt in andere Lebenszyklusphasen verlagert werden.

Wie zu Beginn des Projektes geplant, wurde die Extraktion aus Hahnenkämmen mit einem Fermentationsprozess (Streptococcus) verglichen. Dies sollte als Grundlage dienen, die im Projekt zu entwickelnde Fermentation mit Bäckerhefen bezüglich ihrer Konkurrenzfähigkeit zu bewerten. Im Projektverlauf wurde entschieden, den Plan der HA-Fermentation mit Hefen nicht weiter zu verfolgen. Die Gründe hierfür sind im Arbeitsprogramm 5.3 dargestellt. Diese Projektentscheidung hatte Einfluss auf die folgenden APs bzw. Meilensteine.

3.5.1 Arbeitspaket 19 (AP19)

Die Aufgabe in AP 19 war die ökologische und ökonomische Evaluation der bestehenden Produktionssysteme gegenüber den in diesem Projekt erarbeiteten Technologien. Im Projekt konnte kein Fermentationsprozess mit Bäckerhefe zur Herstellung von HA etabliert werden. Hieraus kann abgeleitet werden, dass HA-Fermentation mit Bäckerhefe zum gegenwärtigen Kenntnisstand weder ökonomisch noch ökologisch sinnvoll ist. Eine quantitative Untersuchung entfällt.

Meilenstein 9 (MS9): Ökobilanzielle Bewertung zweier industriell angewendeter Prozesse für HA Produktion (Hahnenkamm und Streptococcus)

Meilenstein 10 (MS10): Ökobilanzielle Bewertung des neuen Herstellungsprozesses mit rekombinanter Hefe

Aus den im AP 19 aufgeführten Gründen war es nicht möglich MS10 in geplanter Art und Weise durchzuführen. Es wurde entschieden, zusätzlich die neuartige HA Fermentation mittels *Lactococcus lactis* zu bewerten. Der vorliegende Bericht ist damit eine Weiterentwicklung des Meilensteins 9. Das Ziel bei der nun durchgeführten Berechnung verschiedener Szenarien ist eine Einschätzung über die Konkurrenzfähigkeit im Bezug auf Umweltgesichtspunkte von Fermentationsprozessen gegenüber der Extraktion aus Hahnenkämmen.

Die folgenden Szenarien wurden betrachtet:

- Extraktion aus Hahnenkämmen
- Fermentation (Streptococcus) mit chemischer Quervernetzung der HA (crosslinking)
- Fermentation (Streptococcus)
- Fermentation (Lactococcus)

Das Vorgehen orientierte sich an den ISO-Standards für LCA (ISO 14040/14044). Wie im Bereich business-to-business üblich, wurde die Systemgrenze 'von der Wiege bis zum Fabrikator' (engl.: *cradle-to-gate*) gewählt. Dies bedeutet, dass die Modelle den kompletten Lebenszyklus von der Extraktion der Rohstoffe über Herstellung der Vorprodukte und Hilfsstoffe bis zum fertigen Produkt beinhalten. Auch die Behandlung von Abfällen, die bei

den Produktionsprozessen entlang der Wertschöpfungskette auftreten, wird betrachtet. Das Hintergrundsystem wurde mit Datensätzen aus der Sachbilanz-Datenbank ecoinvent [24] abgebildet. Als Bewertungssysteme wurden die Bewertungssysteme ReCiPe Midpoint (H) und ReCiPe Endpoint (H,A) verwendet. Alle Modelle wurden mit der LCA-Software Umberto NXT Universal (ifu 2016) erstellt. Ein Beispiel für ein solches Stoffstrommodell findet sich in **Abb. 3.5.1**. Im Folgenden wird kurz vorgestellt, auf welchen Literaturquellen die Modelle hauptsächlich beruhen.

Balazs [25] beschreibt die Extraktion aus Hahnenkämmen in einem fünfstufigen Prozess. Zunächst werden Spitzen und Basis der Hahnenkämme abgetrennt und zerkleinert. Hieraus wird mehrfach extrahiert (die ersten beiden Phasen) um anschließend mit der Aufreinigung zu beginnen, die wiederum die restlichen drei Phasen einnimmt. Alleine die letzte Phase ("Stage V") besteht aus wiederholtem Waschen mit anschließender Ausfällung (sechsmal) bevor die HA gefriergetrocknet wird.

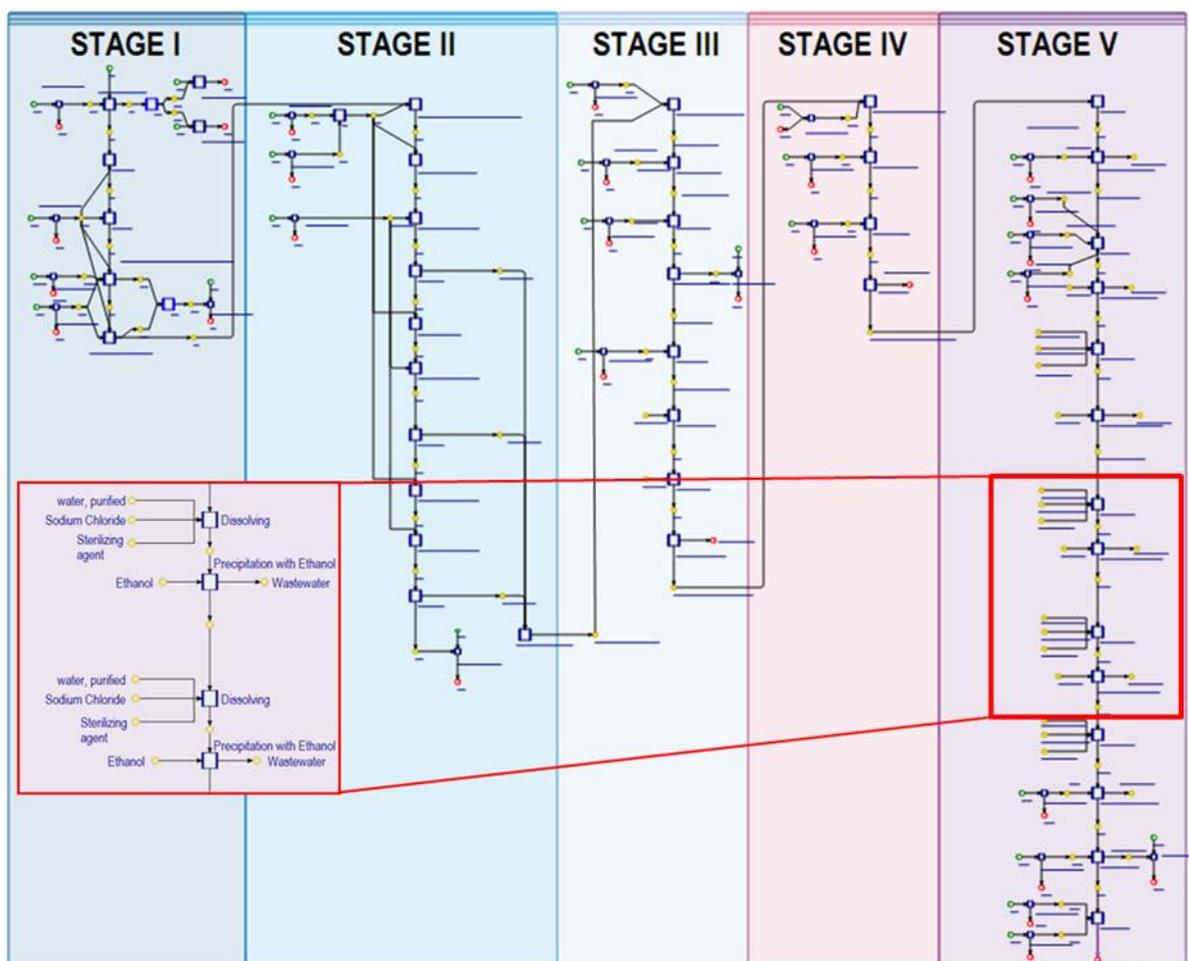


Abbildung 3.5.1: Stoffstromnetz zur Berechnung der LCA von HA, Szenario Extraktion aus Hahnenkamm. Da es sich um ein umfangreiches Modell handelt, wurde ein Bereich aus "Stage V" zur besseren Ansicht vergrößert.

Die *Streptococcus*-Szenarien beruhen auf Patenten von Reliance Life Sciences Pvt., Ltd [26], Carlino und Magnette [27], sowie Chen et al. [28]. Die Informationen zur Fermentation des *Lactococcus*-Szenario wurden aus Kaur und Guhan [23] sowie ergänzenden Informationen hierzu entnommen. Um die Aufreinigung abzubilden, wurden die Prozesse der *Streptococcus*-Szenarien angepasst. Informationen aus Biwer [29] wurden für alle Szenarien genutzt, um Datenlücken, bspw. zum Energieverbrauch beim Rühren, mit Richtwerten zu

versehen. **Abb. 3.5.2** zeigt das Stoffstrommodell des Szenarios "Fermentation (*Streptococcus*) mit chemischer Quervernetzung der HA (*crosslinking*)"

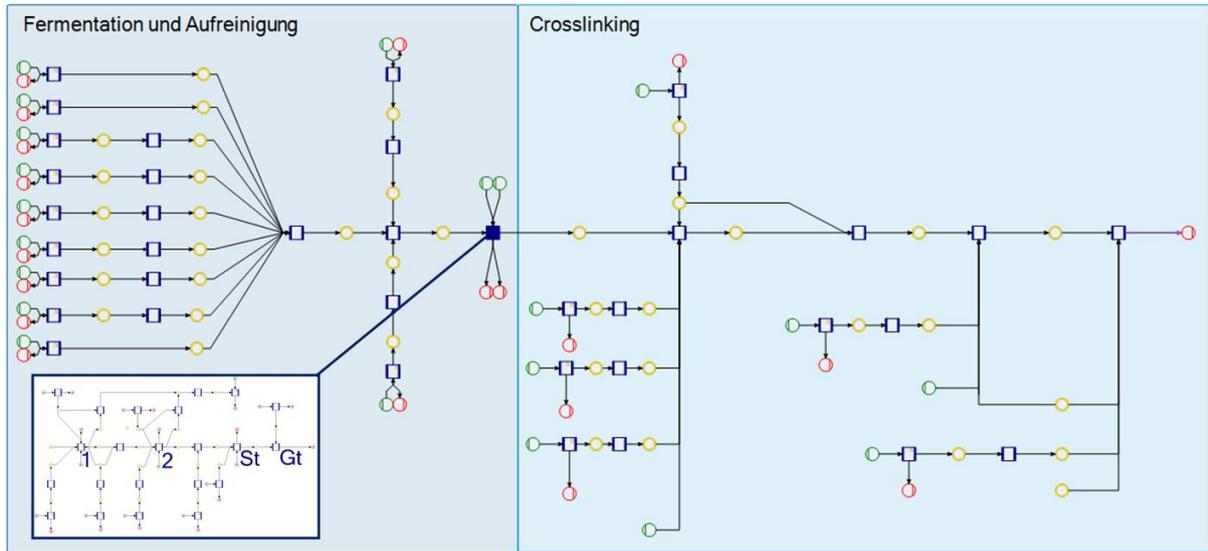


Abbildung 3.5.2: Stoffstromnetz zur Berechnung der LCA von HA, Szenario "Fermentation (*Streptococcus*) mit chemischer Quervernetzung der HA (*crosslinking*)". Dieses Szenario ist hierarchisch aufgebaut. Der dunkel eingefärbte Prozess bspw. beinhaltet einen weiteren Netzteil: Die Aufreinigung mit mehreren Filtrierungsschritten (1 und 2, *Cross-Flow Filtration*), Sterilisation (St) und Gefriertrocknung (Gt).

Ergebnisse: Die oben beschriebenen Modelle wurden mit ausgewählten Wirkungskategorien bewertet und sollen hier vergleichend dargestellt werden. Hiermit wird den ISO-Normen ISO 14040/14044 gefolgt, die eine nicht-aggregierte Bewertung fordern. Bei der Deutung der Fingerprints in **Abb. 3.5.3** ist die Skalierung zu beachten.

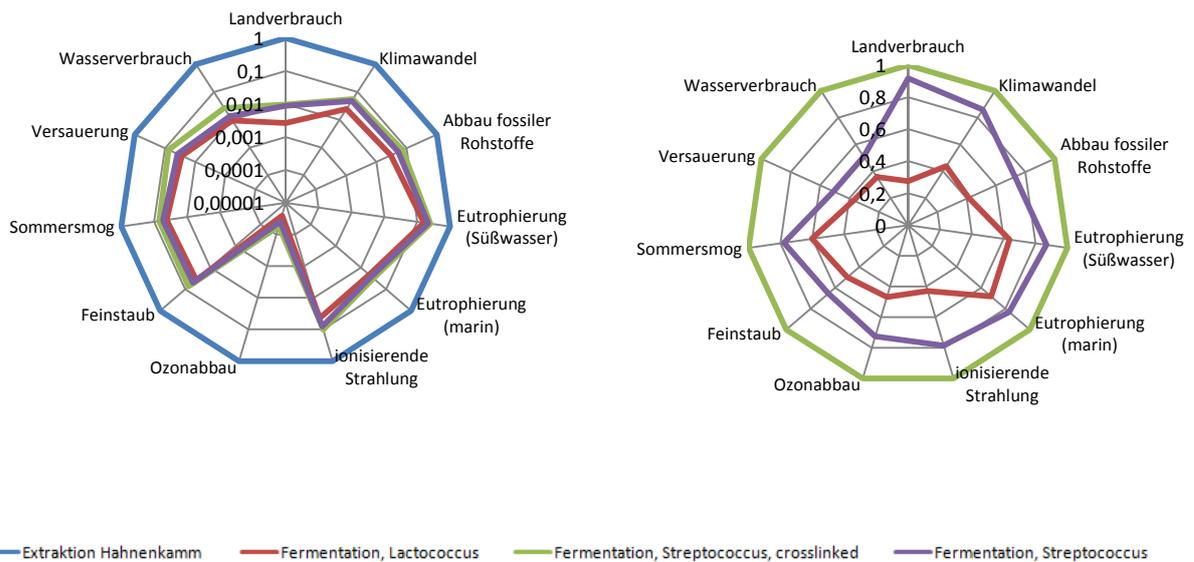


Abbildung 3.5.3: Die Ergebnisse (berechnet mit dem Bewertungssystem ReCiPe Midpoint) der Szenarien im Vergleich als sogenannter Fingerprint. Bei dieser Darstellungsart wird jeweils der höchste Wert einer Wirkungskategorie auf den Wert 1 normalisiert. Links die Ergebnisse für alle

Szenarien mit einer logarithmischen Skalierung der Achse. Auf der linken Abbildung finden sich nur die Fermentationsszenarien im Vergleich untereinander, die Achse ist linear skaliert.

Im Folgenden werden die Hotspots der verschiedenen Szenarien beschrieben. Hierzu wird das Bewertungssystem ReCiPe Endpoint (H,A) benutzt. Dieses Bewertungssystem berechnet einen sogenannten *Single-Score-Indicator*, es wird also ein Wert berechnet, der mittels Gewichtung die verschiedenen Wirkungskategorien zu einem Endergebnis aufsummiert. Genannt werden dann jeweils die Materialien oder Prozesse, die den größten Anteil am Gesamtergebnis haben.

Zunächst werden in **Abb. 3.5.4** die Ergebnisse der Fermentationsszenarien dargestellt. Die Prozesse Cross-Flow Filtration 1 und 2 sind Hotspots für alle Szenarien. Diese Prozessschritte sind Teil der Aufreinigung und sind sowohl Wasser- als auch Energieintensiv. Beim Szenario "Streptococcus, crosslinked" macht die Quervernetzung 5,9 der insgesamt 31,1 points/kg aus. Nicht als Hotspot identifizierte Materialien und Prozesse fallen unter "sonstige" und machen einen relativ geringen Anteil aus.

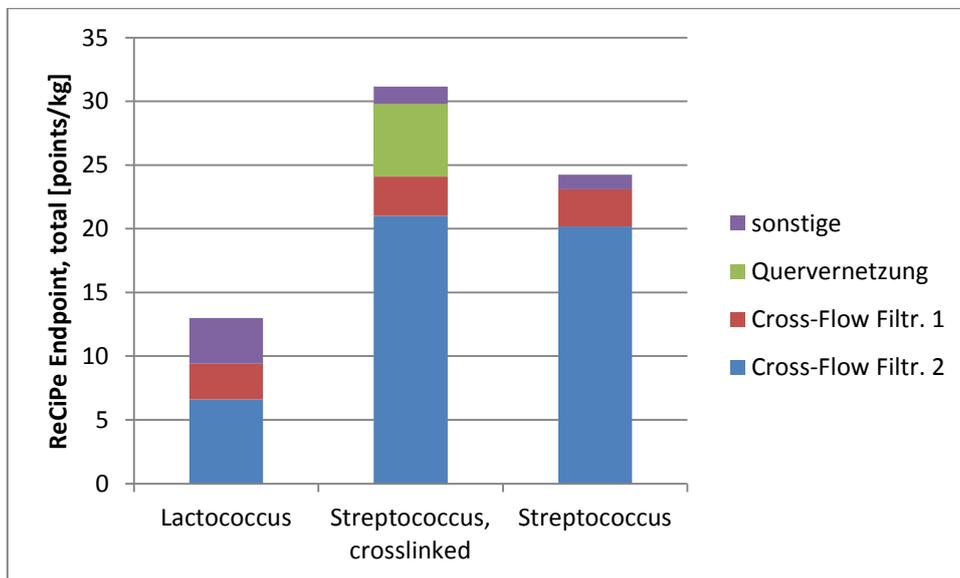


Abbildung 3.5.4: Die Bewertungsergebnisse der Fermentationsszenarien mit dem Bewertungssystem ReCiPe Endpoint (H,A).

Das Szenario "Extraktion, Hahnenkamm" verursacht insgesamt 769 points/kg. Hiervon entfallen 288 points/kg auf Ethanol, 180 points/kg auf Chloroform, 83 points/kg auf Aceton und 54 points/kg auf die Energiebereitstellung.

Diskussion: Im Projektverlauf wurden Stoffstrommodelle für die Herstellung von HA mittels unterschiedlicher Prozesse modelliert und bewertet. Für diese Prozesse liegt nun also jeweils eine LCA vor. Wie oben erläutert, weicht dies vom ursprünglich definierten Ziel ab, einen Prozess mit Bäckerhefen der im Projekt entwickelt werden sollte, im Vergleich zu den anderen zu bewerten. Dies führte dazu, dass alle in die Modelle eingeflossenen Daten entweder aus Literaturquellen stammen oder Daten von Dritten genutzt wurden. Primärdaten sind grundsätzlich die erste Wahl für eine LCA. In Zusammenarbeit mit dem Projektkonsortium, insbesondere AP19, konnte eine Datengrundlage zusammengetragen werden, die den Umständen entsprechend als positiv zu bewerten ist, da viele für eine LCA notwendige Angaben hierüber ermittelt werden konnten.

Die folgende Diskussion bezieht sich auf die LCA-Ergebnisse der potenziellen Umweltauswirkungen, die durch die Produktion von HA verursacht werden. Der gewählte Vergleichsprozess "Extraktion, Hahnenkamm" für hochmolekulare HA ist ein Prozess, der

ebenso auch unter ethischen Aspekten diskutiert werden kann. Dies soll ausdrücklich nicht Inhalt dieses Abschnitts sein.

Extraktion aus Hahnenkamm verursacht sehr hohe Umweltauswirkungen. Große Mengen Lösungsmittel, sowohl Wasser als auch organische Lösungsmittel kommen zum Einsatz. Diese müssen dann erwärmt, warmgehalten und gerührt werden. Entsorgung oder Recycling kommen hinzu. Die Ergebnisse der LCA-Modelle zeigen Nachteile der Extraktion aus Hahnenkämmen gegenüber den untersuchten Fermentations-Szenarien auf. Diese Nachteile beziehen sich auf den Herstellungsprozess und die innerhalb der Systemgrenzen verursachten Umweltauswirkungen. Nachteile in der Anwendung (allergische Reaktionen durch Spuren von Vogelproteinen) liegen außerhalb der Systemgrenzen dieser LCA. Das entsprechende Szenario, "Extraktion, Hahnenkamm" wurde größtenteils auf Grundlage einer Patentschrift aus dem Jahr 1977 modelliert. Es war die für ein LCA-Modell am besten geeignete der verfügbaren Datenquellen. Aktuellere Daten, optimaler Weise Primärdaten eines herstellenden Betriebes, wären wünschenswert. Es ist davon auszugehen, dass das Ergebnis sich bei einer aktuelleren Datenlage verbessert. Der Lösungsmittelverbrauch ist sicher weiter sehr hoch. Aktuellere Quellen zur Extraktion aus Hahnenkämmen, bspw. von Kang et al. [30] waren zur Modellierung ungeeignet.

Für die Fermentationsprozesse wurde ebenfalls auf Literaturdaten zurückgegriffen. Für das *Lactococcus*-Szenario konnten Daten eines Kooperationspartners des iAMBs genutzt werden. Der im Fingerprint zu sehende Vorteil gegenüber den *Streptococcus*-Szenarien lässt sich durch höhere HA-Ausbeute und kürzere Fermentationszeit zurückführen. Der Unterschied ist hier deutlich weniger ausgeprägt als zum Extraktionsprozess. Die Dominanz der Aufreinigung erklärt die Ähnlichkeit der Fingerprints der drei Fermentationsszenarien in **Abb. 3.5.2**.

Die Auswertung mit dem Bewertungssystem ReCiPe Endpoint (H,A) zeigt einen relativ geringen Anteil der Fermentation an der Gesamtwirkung. Bei der Deutung dieser Aussage darf nicht vergessen werden, dass die Fermentationsbrühe mit Ihrer Zusammensetzung maßgeblichen Einfluss auf die nachfolgenden Schritte hat.

Fazit: Im Fazit dieses Abschnitts soll zunächst auf den Einsatz der Methode (LCA) eingegangen werden, anschließend auf das Fazit aus der Anwendung ebendieser Methode. LCA ist ein bewährtes Konzept. Für dieses Projekt war eine projektbegleitende LCA geplant. Ein früher Beginn der LCA-Studie für den zu entwickelnden Prozess würde es ermöglichen, die Zwischenergebnisse im weiteren Projektverlauf zu berücksichtigen. Dies ist sicherlich die Idealvorstellung einer LCA innerhalb eines solchen Projektes. Es ist zu begrüßen, dass die LCA-Methode als ganzheitliche Evaluationsmethode in Forschungsprojekten mit Zielen im Nachhaltigkeitskontext zum Einsatz kommt.

Tatsächlich wurden, begründet aus dem Projektverlauf, für die Erstellung der LCA-Modelle keine Primärdaten aus diesem Projekt genutzt. Stattdessen wurde eine LCA ausschließlich auf Literatur- und Drittdaten durchgeführt. Für die Fermentationsprozesse wäre eine Grundlage von Primärdaten, die Fermentation und Aufreinigung umfassen wünschenswert, um die Validität der hier gemachten Aussagen zu verstärken. Nichtsdestotrotz weisen die Fermentationsprozesse im Vergleich zur Extraktion Werte für alle betrachteten Wirkungskategorien auf, die eine klare Aussage ermöglichen: Die vorliegenden Modelle zeigen auch unter Berücksichtigung von Unsicherheiten, dass die fermentative Herstellung hochmolekularer HA und deren Aufreinigung mit allerhöchster Wahrscheinlichkeit aus Umweltgesichtspunkten dem Extraktionsprozess aus Hahnenkamm vorzuziehen ist. Hieraus lässt sich die Aussage ableiten, dass es grundsätzlich sinnvoll und aus Umweltaspekten wünschenswert ist, die fermentative Herstellung hochmolekularer HA weiter zu entwickeln.

Dies ist eine Information, die die Arbeiten der Projektpartner bestärkt und Ihnen bei zukünftigen Projekten und Forschungsvorhaben hilfreich sein kann. Ein Projekt, das diese Prozesse, von der Fermentation bis zum medizinisch nutzbaren Produkt, verbessert, wäre hierzu sinnvoll.

4. Öffentlichkeitsarbeit

Die Ergebnisse werden in 2017 in Form von drei Dissertationen veröffentlicht. Die *in vitro* HA Synthese mit Enzymmodulsystemen wird in 2017 in Form einer Publikation in einem Fachjournal publiziert. In einem Anschlussprojekt werden die Projektpartner ab 2017 im Rahmen des KMU-Innovation Förderkonzepts des BMBFs die Entwicklung eines Enzym-Membranreaktors für die Synthese von Hyaluronan bearbeiten. Ebenso werden die ersten erfolgreichen Arbeiten zu neuen HA-Synthasen und deren Nutzung in *Lactococcus lactis* für die HA Synthese im Rahmen der Kooperation mit dem indischen Kooperationspartner fortgeführt.

5. Fazit

Zusammenfassend hat das Projekt HYALURONAN-Polymer wertvolle Erkenntnisse zur Synthese von hochmolekularer Hyaluronsäure mit Enzymmodulsystemen oder mittels Ganzzell-Biotransformation geliefert. Erstmals wurde ein Hochdurchsatz-Durchmusterungssystem für Enzymvarianten etabliert. Neue HA-Synthasen wurden identifiziert und *Lactococcus lactis* als neuartiger Produktionsorganismus für die zukünftige HA Produktion vorgestellt. Schließlich wurde die Analytik von hochmolekularer Hyaluronsäure etabliert und validiert. Insgesamt haben die Ergebnisse des Projekts ein Anschlussprojekt der Projektpartner und weitergehende Kooperationen ermöglicht.

6. Literaturangaben

- [1] C. Wahl, D. Hirtz, L. Elling, Multiplexed Capillary Electrophoresis as Analytical Tool for Fast Optimization of Multi-Enzyme Cascade Reactions – Synthesis of Nucleotide Sugars, *Biotechnol. J.* 11(10) (2016) 1298-1308.
- [2] T. Kotake, S. Hojo, D. Yamaguchi, T. Aohara, T. Konishi, Y. Tsumuraya, Properties and Physiological Functions of UDP-Sugar Pyrophosphorylase in *Arabidopsis*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71(3) (2007) 761-771.
- [3] M.M. Muthana, J. Qu, M. Xue, T. Klyuchnik, A. Siu, Y. Li, L. Zhang, H. Yu, L. Li, P.G. Wang, X. Chen, Improved one-pot multienzyme (OPME) systems for synthesizing UDP-uronic acids and glucuronides, *Chem. Commun.* 51(22) (2015) 4595-4598.
- [4] A.M. Pieslinger, M.C. Hoepflinger, R. Tenhaken, Cloning of Glucuronokinase from *Arabidopsis thaliana*, the Last Missing Enzyme of the myo-Inositol Oxygenase Pathway to Nucleotide Sugars, *J. Biol. Chem.* 285(5) (2010) 2902-2910.
- [5] W. Jing, P.L. DeAngelis, Dissection of the two transferase activities of the *Pasteurella multocida* hyaluronan synthase: two active sites exist in one polypeptide, *Glycobiology* 10(9) (2000) 883-889.
- [6] W. Jing, P.L. DeAngelis, Synchronized Chemoenzymatic Synthesis of Monodisperse Hyaluronan Polymers, *J. Biol. Chem.* 279(40) (2004) 42345-42349.
- [7] V.L. Tlapak-Simmons, B.A. Baggenstoss, T. Clyne, P.H. Weigel, Purification and Lipid Dependence of the Recombinant Hyaluronan Synthases from *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus equisimilis*, *J. Biol. Chem.* 274(7) (1999) 4239-4245.
- [8] K. Todoroki, T. Hayama, S. Ijiri, A. Kazuta, H. Yoshida, H. Nohta, M. Yamaguchi, Rhodamine B amine as a highly sensitive fluorescence derivatization reagent for saccharides in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr.A* 1038(1-2) (2004) 113-120.
- [9] K. Yamamoto, K. Hamase, K. Zaitzu, 2-Amino-3-phenylpyrazine, a sensitive fluorescence prelabeling reagent for the chromatographic or electrophoretic determination of saccharides, *J. Chromatogr.A* 1004(1-2) (2003) 99-106.

- [10] K. Kumari, B.A. Baggenstoss, A.L. Parker, P.H. Weigel, Mutation of Two Intramembrane Polar Residues Conserved within the Hyaluronan Synthase Family Alters Hyaluronan Product Size, *J. Biol. Chem.* 281(17) (2006) 11755-11760.
- [11] P.H. Weigel, B.A. Baggenstoss, Hyaluronan synthase polymerizing activity and control of product size are discrete enzyme functions that can be uncoupled by mutagenesis of conserved cysteines, *Glycobiology* 22(10) (2012) 1302-1310.
- [12] K. Miyazaki, Chapter seventeen - MEGAWHOP Cloning: A Method of Creating Random Mutagenesis Libraries via Megaprimer PCR of Whole Plasmids, in: V. Christopher (Ed.), *Meth. Enzymol.*, Academic Press 2011, pp. 399-406.
- [13] P.L. DeAngelis, A.M. Achyuthan, Yeast-derived Recombinant DG42 Protein of *Xenopus* Can Synthesize Hyaluronan in Vitro, *J. Biol. Chem.* 271(39) (1996) 23657-23660.
- [14] J. Wendland, Y. Schaub, A. Walther, *N*-Acetylglucosamine Utilization by *Saccharomyces cerevisiae* Based on Expression of *Candida albicans* NAG Genes, *Appl. Environ. Microbiol.* 75(18) (2009) 5840-5845.
- [15] L.I. Álvarez-Añorve, M.L. Calcagno, J. Plumbridge, Why Does *Escherichia coli* Grow More Slowly on Glucosamine than on *N*-Acetylglucosamine? Effects of Enzyme Levels and Allosteric Activation of GlcN6P Deaminase (NagB) on Growth Rates, *J. Bacteriol.* 187(9) (2005) 2974-2982.
- [16] N.E. S., S.A. Zh, Martynenko N.N., N. G.I., Molecular polymorphism of IB-fructosidase SUC genes in the yeast, *Mol. Biol.* 48(4) (2014) 658-668.
- [17] J.F. Nijkamp, M. van den Broek, E. Datema, S. de Kok, L. Bosman, M.A. Luttkik, P. Daran-Lapujade, W. Vongsangnak, J. Nielsen, W.H. Heijne, P. Klaassen, C.J. Paddon, D. Platt, P. Kötter, R.C. van Ham, M.J. Reinders, J.T. Pronk, D. de Ridder, J.-M. Daran, De novo sequencing, assembly and analysis of the genome of the laboratory strain *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D, a model for modern industrial biotechnology, *Microb. Cell Fact.* 11(1) (2012) 36.
- [18] M.J. Charron, R.A. Dubin, C.A. Michels, Structural and functional analysis of the MAL1 locus of *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* 6(11) (1986) 3891-3899.
- [19] A.S. Batista, L.C. Miletti, B.U. Stambuk, Sucrose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* Lacking Hexose Transport, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 8(1) (2004) 26-33.
- [20] J.J. Scarcelli, P.A. Colussi, A.-L. Fabre, E. Boles, P. Orlean, C.H. Taron, Uptake of radiolabeled GlcNAc into *Saccharomyces cerevisiae* via native hexose transporters and its *in vivo* incorporation into GPI precursors in cells expressing heterologous GlcNAc kinase, *FEMS Yeast Res.* 12(3) (2012) 305-316.
- [21] P. Jin, L. Zhang, P. Yuan, Z. Kang, G. Du, J. Chen, Efficient biosynthesis of polysaccharides chondroitin and heparosan by metabolically engineered *Bacillus subtilis*, *Carbohydr. Polymers* 140 (2016) 424-432.
- [22] S.B. Prasad, G. Jayaraman, K.B. Ramachandran, Hyaluronic acid production is enhanced by the additional co-expression of UDP-glucose pyrophosphorylase in *Lactococcus lactis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86(1) (2010) 273-83.
- [23] M. Kaur, G. Jayaraman, Hyaluronan production and molecular weight is enhanced in pathway-engineered strains of lactate dehydrogenase-deficient *Lactococcus lactis*, *Metabol. Eng. Commun.* 3 (2016) 15-23.
- [24] ecoinvent Centre (2016): ecoinvent v3.2. Dübendorf, Schweiz.
- [25] E.A. Balazs. (1979). Ultrapure hyaluronic acid and its use. Copyright (C) 2013 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., Biotrics, Inc., USA . US4141973A.
- [26] J. Dharmendra, A. Kapat, V. Nataraj, V. Rangaswamy, V. Santosh, H. Velankar. (2009). Efficient process for purification of high molecular weight hyaluronic acid. EP20070859586.
- [27] S. Carlino, F. Magnette. (2003). Process for purifying high molecular weight hyaluronic acid. EP20000900777.
- [28] T.C. Chen, L.S. Chen. (2012). Method for producing cross-linked hyaluronic acid. US20120095206 A1.
- [29] A.P. Biwer, Modellbildung, Simulation und ökologische Bewertung in der Entwicklung biotechnologischer Prozesse, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, 2007.
- [30] D.Y. Kang, W.-S. Kim, I.S. Heo, Y.H. Park, S. Lee, Extraction of hyaluronic acid (HA) from rooster comb and characterization using flow field-flow fractionation (FIFFF) coupled with multiangle light scattering (MALS), *J. Sep. Sci.* 33(22) (2010) 3530-3536.

7. Anlagen/Anhang

Anlage 1: Arbeitsprogramme mit Arbeitspaketen und Personaleinsatz

Anlage 2: Übersicht der durchgeführten Projekttreffen

Anlage 3: Übersicht zur Teilnahme an DBU Statusseminaren

RWTH AG Blank (iAMB): Arbeitsprogramm 5.3													
• AP15: Erstellung einer Hyaluronsäure produzierenden Hefe auf Basis der natürlichen Stoffwechselwege: rekombinant werden die Gene <i>hasA</i> (HA-Synthase) und <i>has B</i> (UDP-Glucose dehydrogenase) aus <i>Streptococcus equi sbsp. zooepidemicus</i> überexprimiert	Dokt. 3			MS5									
• AP16: Erstellung einer Hyaluronsäure produzierenden Hefe auf Basis des neuen in vitro Stoffwechselweges (aus Arbeitsprogramm 5.1)	Dokt. 3												
• AP17: Erstellung und Durchmusterung eine Hyaluronsäuresynthase Bibliothek zur Herstellung von hochmolekularer Hyaluronsäure in Bäckerhefe (auf Basis AP 15)	Dokt. 3												
• AP18: Iterative Optimierung der Bäckerhefe für die Herstellung von hochmolekularer Hyaluronsäure.	Dokt. 3												
• AP19: Ökologisch und ökonomische Evaluation der bestehenden Produktionssysteme gegenüber den in diesem Projekt erarbeiteten Technologien	Dokt. 3				MS6								
AG Kuballa (GALAB): Arbeitsprogramm 5.4													
• AP20: Etablierung einer Methode zur präzisen Bestimmung der Molmasse sowie die Molmassenverteilung der HA mittels (HPLC-SEC) und Detektion mittels Brechungsindex. Festlegung eines Molekulargewichts-HA-Standards. Anwendung auf HA-Polymeren mit optimierten rek. Produktionsstämmen (AG Blank) und in vitro Synthese (AG Elling)	Dokt. 4						MS7						
• AP21: Etablierung einer Methode zur schnellen Analyse von HA-Polymergrößen auf der Basis einer Agar-Gelelektrophorese. Anwendung für das Screening von Mutanten (AG Schwaneberg, AG Blank) und die Produktanalyse für in vitro Synthesen (AG Elling)	Dokt. 4						MS7						
• AP22: Entwicklung der Aufreinigung (Downstream-processing) der HA aus Fermentationen mit rek. Produktionsstämmen (AG Blank)	Dokt. 4												
• AP23: Fermentation und Downstream-Processing ausgesuchter optimierter rek. Produktionsstämme zur HA Synthese im Labormaßstab	Dokt. 4												MS8
Unterauftrag (IFU, Hamburg) Arbeitsprogramm 5.5													
Ökobilanzielle Bewertung des Vorhabens	-						MS9						MS10

Anlage 2: Übersicht zu den durchgeführten Projekttreffen

Die Projektpartner (RWTH Aachen und GALAB) trafen sich zur Abstimmung der Projektergebnisse und Projektziele.

Das IFU (Hamburg) nahm am Projekttreffen am 30. Oktober 2013 teil, um Details der Ökoeffizienzanalyse mit den Projektpartnern abzusprechen.

Datum	Ort	Teilnehmer
15.07.2013	Aachen	RWTH Aachen Partner & GALAB
30.10.2013	Aachen	RWTH Aachen Partner & GALAB & ifu Hamburg
16.04.2014	Aachen	RWTH Aachen Partner & GALAB
04.12.2014	Hamburg	RWTH Aachen Partner & GALAB
22.06.2015	Aachen	RWTH Aachen Partner & GALAB
15.02.2016	Aachen	RWTH Aachen Partner & GALAB
13.06.2016	Aachen	RWTH Aachen Partner & GALAB

Anlage 3: Übersicht zur Teilnahme an DBU Statusseminaren

Datum	Ort	Teilnehmer
10.09.2013	Osnabrück/Kickoff	RWTH Aachen Partner & GALAB
11./12.09.2014	Osnabrück	RWTH Aachen Partner & GALAB
27./28.09.2015	Osnabrück	RWTH Aachen Partner/Biotec
27./28.10.2016	Osnabrück	RWTH Aachen Partner/Biomat